

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## EMPLOI DES LYSATS BACTÉRIOPHAGIQUES OBTENUS EN MILIEU NUTRITIF PAUVRE, POUR LA PRÉPARATION DES SÉRUMS ANTIPHAGES (\*)

par PIERRE NICOLLE et PAUL DUCREST.

(*Institut Pasteur. Service du Bactériophage.*)

Nous avons montré précédemment [1] que la lyse bactériophagique s'effectuait encore dans des milieux nutritifs pauvres, comme par exemple une solution de peptone vingt fois plus diluée que l'eau peptonée généralement employée en bactériologie. Nous nous sommes demandé si ces lysats, *a priori* peu toxiques du fait de leur faible teneur en peptone, ne conviendraient pas particulièrement à la préparation des sérums antiphages.

On sait que ces sérums sont d'un emploi courant dans les laboratoires où l'on étudie la bactériophagie. Ils servent notamment à l'identification et à la classification des phages nouvellement isolés. Mais leur préparation au moyen des lysats obtenus en milieux ordinaires est, du fait de la toxicité de ceux-ci, longue, délicate et souvent meurtrière pour les animaux. Il y avait donc intérêt à mettre au point une technique plus simple, plus rapide et surtout présentant moins d'aléas.

Du point de vue théorique, on pouvait se demander, de plus, si l'antigène contenu dans un milieu aussi faiblement chargé en protéines, en acides aminés et en sels minéraux provoquerait, chez l'animal, une élaboration d'anticorps quantitativement comparable à celle qui est déclenchée par les injections de lysats préparés en milieux riches.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 4 décembre 1947.

Accessoirement, la question se posait de savoir ce que devenait le pouvoir antigénique des bactériophages ainsi préparés, après leur inactivation, soit par la chaleur, soit par le formol. Certains auteurs [2, 3] affirment que les phages inactivés par la chaleur gardent leur pouvoir antigénique. D'autres [4] pensent que l'inactivation, provoquée tout au moins par un chauffage modéré (60-70° C), ne détruit pas l'antigénicité, mais ils admettent toutefois que celle-ci ne résiste pas à l'ébullition et à l'autoclavage à 120° C. D'autres enfin [5] — et c'est l'opinion la plus admise aujourd'hui — sont d'avis que les antigènes phagiques disparaissent par le traitement d'une heure à 80° C.

Notons que, pour certains [6, 7], l'inactivation produite dans certaines conditions de pH par une chaleur modérée est réversible.

Pour le formol, les opinions sont unanimes. L'inactivation obtenue avec des concentrations faibles est réversible [4, 5, 8, 9, 10, 11, 12]. R. Wahl [11] a même précisé que l'inactivation et la réactivation suivent une course sensiblement parallèle dans les lysats obtenus en milieux ordinaires et dans les lysats préparés en milieux synthétiques. On admet également que l'inactivation sous l'influence du formol ne prive pas les bactériophages de leur pouvoir antigénique [4, 5, 8, 10].

Il était donc intéressant de chercher si ces faits restent exacts pour les bactériophages préparés en milieu nutritif pauvre.

#### 1° PRÉPARATION DES LYSATS DESTINÉS AUX INJECTIONS.

a) Milieu de culture. Peptone (1) : 1,5 g. pour 1.000 cm<sup>3</sup> d'eau bidistillée. Le pH est ramené à 7 par l'addition de NaOH (généralement 0,75 cm<sup>3</sup> de NaOH N/10 suffisent), sans autre addition de sels minéraux. Le milieu est réparti dans des ballons de Kjeldahl, à raison de 15 cm<sup>3</sup> par ballon de 20 cm<sup>3</sup>.

b) L'ensemencement est effectué en introduisant dans chaque ballon 0,3 cm<sup>3</sup> d'une suspension, en eau bidistillée, de staphylocoque Twort contenant environ 800 millions de germes par centimètre cube. (On emploie, pour faire cette suspension, une culture de dix-huit heures sur gélose inclinée.) Les ballons sont placés dans un bain-marie agitateur, à 37° C. Après deux heures trente, la culture, sans être abondante, est déjà appréciable.

c) On ajoute alors le bactériophage Twort (IV gouttes d'une dilution à 10<sup>-2</sup> en eau bidistillée, d'un bactériophage dont le titre varie assez peu autour de 2 × 10<sup>8</sup>, par ballon). La lyse survient généralement au bout de deux heures à deux heures trente. Elle est pratiquement totale. Le contenu des ballons est mélangé, titré et conservé à la glacière. Le titre obtenu est sensiblement du

(1) Peptone U. C. L. A. F.



même ordre que celui qu'on observe chez les bactériophages préparés en milieux ordinaires ; mais il baisse rapidement. Ainsi un lysat, qui titrait  $1,0 \times 10^9$  à la préparation, est tombé à  $2,7 \times 10^8$  en quarante-huit heures à la glacière. Il est donc nécessaire d'utiliser les lysats le plus rapidement possible.

## 2° PRÉPARATION DES ANIMAUX.

Dans nos premiers essais, nous avons pratiqué plusieurs injections à chaque lapin, à quelques jours d'intervalle. Dans une seconde série d'expériences, les lapins ont reçu une dose unique et massive de lysat. Les injections ont été pratiquées, dans tous les cas mentionnés ici, par la voie péritonéale.

## 3° TITRAGE DU POUVOIR NEUTRALISANT DU SÉRUM ANTIPHAGE.

Dans des tubes à hémolyse contenant IX gouttes (ou mieux, un multiple de IX) de bactériophage d'un titre amené par dilution

TABLEAU I. — Première série : injections multiples de lysat (bactériophage staphylococcique Twort) préparé en milieu peptoné dilué (1,5 g. de peptone pour 1.000 cm<sup>3</sup>). Un même lysat est divisé en trois portions, l'une est injectée sans traitement, la seconde est chauffée à 70° C. La troisième est inactivée par le formol.

LAPINS	NATURE du traitement subi par le lysat	INJECTIONS intrapéritonéales				ACTION NEUTRALISANTE du sérum, en pourcentages de phage neutralisé par les dilutions suivantes de sérum					
		Jour	Dose en centimètres cubes	Titre du lysat		1 p. 10	1 p. 100	1 p. 500	1 p. 1.000	1 p. 2.000	1 p. 4.000
				avant le traitement	au moment de l'injection						
D 12	Non traité.	1	40	$4,7.10^9$	$4,7.10^8$						
		17	20	$8.10^7$	$8.10^7$						
		25	35	$4.10^7$	$4.10^7$						
		66	Saignée.			100	100	100	100	93	90
D 13	Chauffé 30 minutes à 70°.	1	40	$4,7.10^9$	0						
		17	20	$8.10^7$	0						
		25	35	$4.10^7$	0						
		66	Saignée.			0	0	0	0	0	0
D 14	Formolé (1 goutte de formol à 30 p. 100 pour 10 cm <sup>3</sup> de lysat).	1	40	$4,7.10^9$	0						
		17	20	$8.10^7$	0						
		25	35	$4.10^7$	0						
		66	Saignée.			100	100	100	100	100	95

TABLEAU II. — Deuxième série : une unique injection massive de lysat de bactériophage staphylococcique Twort, préparé en milieu peptoné dilué.

LAPINS	NATURE DU TRAITEMENT subi par le lysat	VOLUME DU LYSAT INJECTÉ (en centimètres cubes)	JOURS ÉCOULÉS depuis l'injection	POUVOIR NEUTRALISANT DU SÉRUM vis-à-vis du bactériophage staphylococcique Twort Pourcentages de neutralisation du bactériophage par les dilutions suivantes de sérum					
				1 p. 10	1 p. 100	1 p. 500	1 p. 1.000	1 p. 2.000	1 p. 4.000
				1 p. 10	1 p. 100	1 p. 500	1 p. 1.000	1 p. 2.000	1 p. 4.000
D 18 (neuf)	Non traité. (titre, 2,7.10 <sup>8</sup> ).	145	0	0	0	0	0	0	0
			5	100	100	96	72	n.p. (4)	n.p.
			10	100	91,6	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
			15	100	100	88,5	75	n.p.	n.p.
			21	100	100	99,7	94	78	n.p.
			28	100	100	100	98,8	85	n.p.
			34	100	100	99,7	96	n.p.	n.p.
			89	100	100	100	88,2	n.p.	n.p.
			100	Le lapin meurt d'une infection intercurrente.					
D 19 (neuf)	Formolé. (2) (titre avant formol : 2,7.10 <sup>8</sup> ).	145	0	86,4	80,8				
			5	100	98,8	95,7	88,7	n.p.	n.p.
			10	100	100	96,7	90,2	n.p.	n.p.
			15	100	100	100	98,5	90	n.p.
			21	100	100	100	100	98,5	88
			28	100	100	100	100	99,7	96,7
			34	100	100	100	100	100	98,2
			89	100	100	100	100	100	97,2
			147	100	100	100	100	100	95
D 13 (a reçu antérieurement plusieurs injections de lysat chauffé, v. tableau I).	Formolé. (2) (titre avant formol : 4,8.10 <sup>8</sup> ).	150	0	30	n.p.	0	0	0	0
			3	25	n.p.	0	0	0	0
			7	100	100	100	91	n.p.	0
			12	100	100	100	98	72	29
			21	100	100	97	74	45	n.p.
			30	100	100	100	96	n.p.	n.p.
			45	100	100	98	78	n.p.	n.p.
			64	100	100	99	90	n.p.	n.p.
			119	100	100	94	n.p.	n.p.	n.p.
			177	100	100	95	91	n.p.	n.p.

(1) n.p., neutralisation partielle inférieure à 50 p. 100.

(2) Même dose que pour le lapin D 14 du tableau I, c'est-à-dire 1 goutte de formol à 30 p. 100 pour 10 cm<sup>3</sup> de lysat.

à un titre voisin de  $1 \times 10^4$ , on introduit 1 goutte (ou le multiple choisi) de sérum ou d'une dilution de sérum, de manière à obtenir finalement une échelle de dilutions de sérum allant de 1 p. 10 à 1 p. 5.000. Une échelle témoin est préparée parallèlement avec du sérum de lapin normal. Les tubes sont placés pendant vingt-quatre heures à 37° C. Le titrage s'effectue sui-



vant la méthode classique, qui consiste, étant donné une dilution de bactériophage fournissant un nombre déterminé de plages (environ 1.000), à chercher le pourcentage de phage neutralisé pour chaque dilution de sérum.

#### 4° RÉSULTATS.

Les résultats sont rapportés dans les deux tableaux ci-joints.

#### 5° CONCLUSIONS.

a) Les lysats préparés avec le milieu peptoné dilué (1,5 g. de peptone pour 1.000 cm<sup>3</sup> d'eau bidistillée), dans le cas du bactériophage staphylococcique Twort agissant sur le staphylocoque blanc Twort, sont d'excellents antigènes pour la préparation des sérums antiphages.

b) Ils sont mieux tolérés que les lysats obtenus avec les milieux ordinaires. Ils peuvent être injectés à dose massive et en une seule fois, ce qui constitue un gain de temps important et une simplification notable dans les manipulations.

c) Les anticorps neutralisants vis-à-vis du bactériophage apparaissent très rapidement (moins de cinq jours) dans le sérum des lapins. Au vingtième jour, leur taux a presque atteint son degré le plus élevé. Ils semblent persister longtemps dans le sang circulant.

d) Les lysats, chauffés à 70° C pendant trente minutes, ont perdu presque tout leur pouvoir antigénique.

e) Les lysats inactivés par le formol, au contraire, ont gardé un pouvoir antigénique au moins égal à celui des lysats frais.

f) Certains lapins neufs présentent, vis-à-vis du bactériophage staphylococcique Twort, un taux d'anticorps neutralisants déjà notable.

Ces résultats préliminaires mettent clairement en évidence l'intérêt des lysats bactériophagiques préparés avec les milieux pauvres. Ils nous ont incités à entreprendre de nouvelles recherches sur lesquelles nous reviendrons prochainement.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] NICOLLE (P.) et DUCREST (P.). *Ces Annales*, 1947, 73, 755.
- [2] ARNOLD (L.) et WEISS (E.). *J. infect. Dis.*, 1924, 35, 603.
- [3] ASHESHOW (I. N.). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 93, 1327.
- [4] MUCKENFUSS (R. S.). *J. exp. Med.*, 1928, 48, 709.
- [5] SCHULTZ (E. W.), QUIGLEY (J. S.) et BULLOCK (L. T.). *J. Immunol.*, 1929, 47, 245.
- [6] KRUEGER (A. P.) et SCRIBNER (E. J.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1935, 33, 21.

- [7] KRUEGER (A. P.) et MUNDELL (J. H.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1936, **34**, 410.
- [8] SCHULTZ (E. W.) et GEBHARDT (L.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1935, **32**, 1111.
- [9] KENDALL (A. I.) et COLWELL (Ch. A.). *J. infect. Dis.*, 1938, **63**, 81.
- [10] MORIYAMA (H.) et OHASHI (Sh.). *Arch. ges. Virusforsch.*, 1939, **4**, 252.
- [11] WAHL (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 237.
- [12] KLIGLER (I. J.) et OLEINIK. *J. Immunol.*, 1943, **47**, 325.



**LA 2-MÉTHYL-4-AMINO-5-AMINO-MÉTHYL-PYRIMIDINE**  
**FACTEUR DE CROISSANCE**  
**POUR LES FORMES S ET R D'UNE SOUCHE**  
**DE BACILLES PARATUBERCULEUX**

par A. LUTZ (\*).

Au cours de l'étude entreprise sur la croissance des bacilles paratuberculeux, de leur pouvoir de synthèse vitaminique et de leurs exigences nutritives, nous avons pu constater qu'un grand nombre d'entre eux poussaient facilement sur des milieux synthétiques divers (Sauton, Long, Hendey, etc.) plus ou moins tamponnés. Ils synthétisent l'aneurine. Sünderlin et Werkmann avaient déjà montré que les bacilles du smegma, de Timothée, de Möller étaient autotrophes pour cette vitamine. Les dosages effectués sur les filtrats de cultures (âgées de vingt et un jours) de certains d'entre eux sur milieu de Sauton (50 cm<sup>3</sup>) par la méthode de Schopfer à l'aide du test *Phycomyces*, nous ont donné les résultats suivants :

TABLEAU I.

BACILLES PARATUBERCULEUX	POIDS SEC des bacilles en mg.	ANEURINE en µg. par cm <sup>3</sup>	ANEURINE en µg. filtrat total	RAPPORT ANEURINE EN µg. POIDS SEC EN MG.
Fléole (1). . . . .	240	0,24	9,6	$\frac{9,6}{240} = 0,04$
Darier (1). . . . .	450	0,29	9	$\frac{9}{450} = 0,02$
Smegma. . . . .	360	0,3	8,1	$\frac{8,1}{360} = 0,025$
Grassberger, variété blanche.	355	0,24	9,6	$\frac{9,6}{355} = 0,032$
Moeller. . . . .	502	0,34	9,3	$\frac{9,3}{502} = 0,019$

(1) A. ANDREJEW, ces *Annales*, 1946, 72, 611.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 Décembre 1947.

Nous avons rapporté au cours d'études antérieures le cas des bacilles paratuberculeux de Pellegrini [2], de Boquet (B1) [2] et d'un bacille isolé d'une acné comédonienne [3], qui nécessitent comme facteur de croissance exogène la pyrimidine (de l'aneurine). L'étude systématique d'autres bacilles paratuberculeux nous a amené à examiner la croissance de l'un d'entre eux isolé à l'Institut de Bactériologie de Lausanne, à partir de sable de route et étudié par Sansonnens [4]. Ces bacilles sont acido-alcool-résistants et sont pour la plupart sous forme de petits bâtonnets trapus. Il y a quelques formes coccoides. L'addition des divers facteurs du complexe vitaminique B nous a permis d'observer une action très nette de l'aneurine sur la croissance bacillaire. L'adjonction au milieu de Sauton de doses croissantes d'aneurine nous a permis d'obtenir un voile d'aspect lisse et de couleur ocre jaune. Il y a un léger dépôt au fond des ballons. Le milieu est clair. Il s'agit de la forme lisse de ces bacilles.

En partant du voile lisse et après plusieurs repiquages, sur milieu synthétique, lors d'une série d'expériences destinées à étudier l'action comparée de l'aneurine et de la pyrimidine mettant en évidence que seule la pyrimidine était responsable de l'effet constaté, nous avons observé une dissociation avec transformation de la forme S (Smooth) en forme R (Rough). La forme R est constituée par des bacilles acido-alcool-résistants en forme de bâtonnets plus ou moins longs et grêles dont certains présentent des granulations. Après addition de pyrimidine ce type pousse sur milieu de Sauton sous forme d'un voile plissé, grimpant le long de la paroi et qui s'épaissit au fur et à mesure que les taux du facteur de croissance précité ajoutés augmentent. La couleur du voile passe de la teinte crème à l'ocre jaune. Il n'y a pas de dépôt au fond du ballon. Le milieu est clair.

Ce travail a pour but l'étude comparée de l'action de la 2-méthyl-4-amino-5-amino-méthyl-pyrimidine sur les types S et R

#### I. — ACTION COMPARÉE DE L'ANEURINE ET DE SES CONSTITUANTS SUR LES FORMES S ET R.

La méthode suivie a été décrite dans nos communications précédentes [2, 3].

a) *Forme S* : Voici les résultats trouvés pour la forme S après six semaines de croissance à l'étuve à 37° (v. tableau II).

b) *Forme R* : Après quatre semaines de croissance à l'étuve à 37° (v. tableau III).

Transcrivons les résultats de ces deux tableaux sur un graphique (v. graphique 1).

L'examen de ce graphique nous montre que :



a) Seule la pyrimidine est responsable de l'effet observé dans les deux cas. Le thiazol est sans effet. Le rendement de la

TABLEAU II.

	POUR 50 CM <sup>3</sup> DE MILIEU						
	T	0,31	0,62	1,25	3,1	6,25	12,5
Pyrimidine (P) en $\mu$ g. . . . .	2	21	62	134	200	220	180
Poids sec des bacilles en mg.							
Thiazol (Th) en $\mu$ g. . . . .	—	0,21	0,42	0,84	2,1	4,2	8,4
Poids sec des bacilles en mg.		—	—	—	2	2	3
P en $\mu$ g. . . . .	—	0,31	0,62	1,25	3,1	6,25	12,5
+ Th en $\mu$ g. . . . .		+	+	+	+	+	+
Poids sec des bacilles en mg.	2	20	68	150	180	190	175
Aneurine (A) en $\mu$ g. . . . .	—	0,5	1	2	5	10	20
Poids sec des bacilles en mg.	1	30	85	147	187	227	201

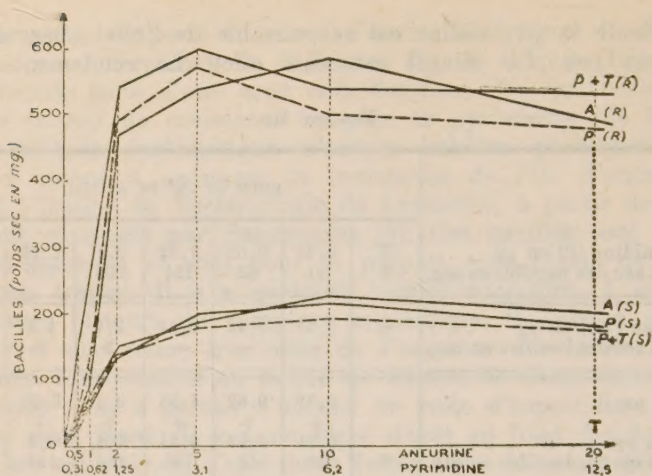
TABLEAU III.

	POUR 50 CM <sup>3</sup> DE MILIEU							
Pyrimidine (P) en µg. . . . .	T	0,06	0,31	0,62	1,25	3,1	6,2	12,5
Poids sec des bacilles en mg.	1	6	50	140	490	569	505	476
Thiazol (T) en µg. . . . .	T	0,04	0,21	0,42	0,84	2,1	4,2	8,4
Poids sec des bacilles en mg.	—	—	—	—	—	1	2	2
P en µg. . . . .	—	0,06	0,31	0,62	1,25	3 1	6,2	12,5
+ Th. en µg. . . . .		+	+	+	+	+	+	+
Poids sec des bacilles en mg.	1	11	118	216	543	596	540	532
Aneurine (A) en µg. . . . .	T	0,1	0,5	1	2	5	10	20
Poids sec des bacilles en mg.	1	11	43	90	470	538	590	490

récolte bacillaire est plus élevé pour la forme R. L'action est plus rapide sur la forme R que sur la forme S.

b) Pour la forme R, on voit par intrapolation qu'il y a un maximum d'action entre 1,25  $\mu$ g et 3,1  $\mu$ g de pyrimidine. L'aneurine et la pyrimidine n'agissent pas à taux équimoléculaire en pyrimidine active. Le composant pyrimidinique agit à taux inférieurs pour un effet optimum.

c) Pour la forme S, on voit par intrapolation que, comme dans le



GRAPHIQUE 1.

cas précédent, le composant pyrimidinique produit son effet maximum pour un taux inférieur à celui de l'aneurine (en pyrimidine active).

## II. — ACTION COMPARÉE DE LA 2-MÉTHYL-4 AMINO-5 AMINO-MÉTHYL-PYRIMIDINE SUR LES FORMES S ET R EN FONCTION DU TEMPS.

Nous avons suivi l'action de la pyrimidine en fonction du temps pour divers taux ajoutés au milieu pour les formes S et R.

a) *Forme S* :

TABLEAU IV.

TEMPS (jours)	PYRIMIDINE EN µg. POUR 50 CM <sup>3</sup> DE MILIEU							
	T	0,1	0,5	1,5	2,5	5	10	10
Ensemencement (1) :	—							
14 après . . . .	—	2	4	5	3	2	2	2
28 après . . . .	—	2	38	79	90	115	139	130
35 après . . . .	—	7	36	80	120	140	200	173
42 après . . . .	—	9	55	78	101	227	297	254
49 après . . . .	1	10	55	65	110	200	260	230
56 après . . . .	1	8	52	82	125	190	290	180

(1) Poids sec des bacilles en milligrammes.



b) *Forme R* :

TABLEAU V.

TEMPS (jours)	PYRIMIDINE EN $\mu\text{G.}$ POUR 50 $\text{CM}^3$ DE MILIEU								
	T	0,1	0,5	1	1,5	2,5	5	10	20
Ensemencement :									
10 après . . .	—	40	41	42	44	42	40	44	46
15 après . . .	—	15	36	63	64	73	88	122	108
21 après . . .	—	15	75	135	162	171	225	256	284
28 après . . .	1	10	70	160	511	542	530	500	435
30 après . . .	1	14	72	170	520	560	550	493	456
35 après . . .	1	15	70	155	547	567	520	484	467

Reportons les chiffres obtenus dans les deux tableaux précédents sur un graphique tridimensionnel (v. graphique 2).

L'examen de ce graphique nous permet de constater les faits suivants :

1° En fonction des taux croissants de pyrimidine :

a) Il y a un développement optimum :

Du type S . . . . . pour 10  $\mu\text{g.}$  de pyrimidine.

Du type R . . . . . pour 2,5  $\mu\text{g.}$  de pyrimidine.

b) « Le coefficient économique d'activité » est de :

$$\frac{290.000}{10} = 29.000 \text{ pour le type S.}$$

$$\frac{500.000}{2,5} = 200.000 \text{ pour le type R.}$$

Voici comment on peut placer ces quotients par rapport à ceux d'autres micro-organismes :

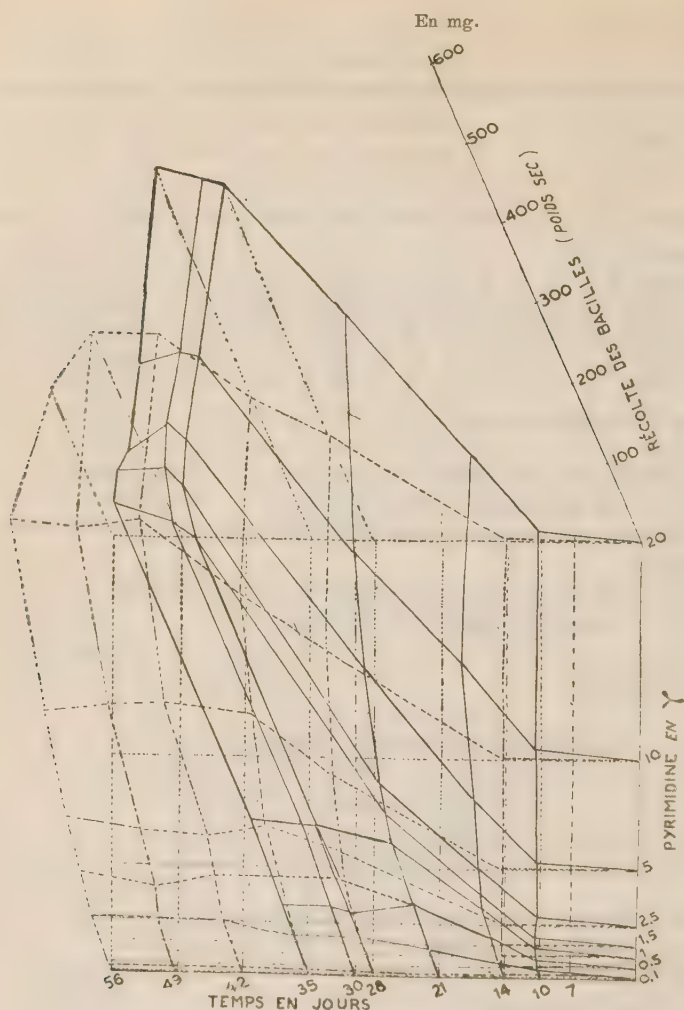
Forme S . . . . .	29.000
Bacille de Pellegrini . . . . .	70.000
Bacille paratuberculeux d'origine acnéenne . . . . .	170.000
<i>Rhodotorula</i> (Schopfer) . . . . .	150.000-200.000
Forme R . . . . .	200.000
Bacille de Boquet (B1) . . . . .	400.000

2° En fonction du temps :

a) Le temps de latence dure environ deux à trois semaines pour la forme S, alors qu'il n'est que de dix jours pour la forme R.

b) La croissance est plus rapide et plus importante quantitativement pour la forme R durant la phase exponentielle.

c) On note un maximum de développement après six semaines pour la forme S et après quatre semaines pour la forme R.



GRAPHIQUE 2.

### III. — SPÉCIFICITÉ DE L'ACTION DE LA 2-MÉTHYL-4-AMINO-5-AMINO-MÉTHYL-PYRIMIDINE SUR LES FORMES S ET R.

L'étude de l'action de plusieurs pyrimidines nous a montré que la 2-4-dioxypyrimidine (Uracile) et la 2-méthyl-4-oxy-6-amino-pyrimidine étaient sans action sur la croissance des formes S et R. Nous rapportons ici l'action comparée de la pyri-



midine (de l'aneurine) [P I] et de la 2-méthyl-4-amino-5-thioformyl-amino-méthyl-pyrimidine (P II).

TABLEAU VI.

PYRIMIDINES EN $\mu$ G. pour 50 cm <sup>3</sup> de milieu	FORME S		FORME R	
	P I	P II	P I	P II
T. . . . .	—	—	—	—
3,1 . . . . .	200	—	569	—
6,2 . . . . .	220	5	555	5
12,5 . . . . .	180	18	476	40
25,0 . . . . .	190	90	470	120
50,0 . . . . .		120		242

L'examen de ce tableau nous montre que la spécificité est relativement assez marquée pour la souche R et la souche S. On retrouve le fait que la position en -4- du groupement NH<sub>2</sub> est indispensable.

L'action du thiochrome nous a donné les résultats suivants :

TABLEAU VII.

THIOCHROME EN $\mu$ G.	10	20	40	80
Poids sec en mg. :				
Forme S. . . . .	5	11	28	31
Forme R. . . . .	6	18	32	37

Ce tableau nous montre que le thiochrome est une mauvaise source de pyrimidine pour la forme S et pour la forme R.

L'addition des autres constituants du complexe vitaminique B, à savoir : lactoflavine, acide nicotinique, nicotinamide, acide panthénique, acide *p*-aminobenzoïque, biotine, adermine, acide folique ne nous a pas permis de mettre en évidence une action favorisante sur la croissance de la forme S quand on les a employés seuls ou en combinaison avec la pyrimidine.

#### CONCLUSION.

Les formes R et S synthétisant le 4-méthyl-5-( $\beta$ -oxyéthyl)-thiazol en quantités suffisantes ont perdu le pouvoir de synthétiser la pyrimidine spécifique de l'aneurine. Le « coefficient économique d'activité » de la pyrimidine pour le type R est supérieur

a celui obtenu pour le type S. L'étude des deux formes dissociées de ce bacille paratuberculeux, représentant un stade intermédiaire de l'évolution de l'hétérotrophie, conduisant finalement à une perte complète en ce qui concerne l'aneurine, est une nouvelle preuve du principe de l'indépendance systématique de l'hétérotrophie fractionnée.

Il est intéressant de constater que comme pour les bacilles paratuberculeux étudiés précédemment (2, 3), la perte de pouvoir de synthèse affecte une partie constituante de la molécule d'aneurine et en particulier la partie pyrimidinique.

Nous remercions M. le professeur Hauduroy qui a bien voulu nous permettre d'étudier cette souche appartenant à sa collection personnelle.

Les produits biochimiques ont été aimablement mis à notre disposition par les Etablissements Scientifiques Hoffmann-La Roche (Bâle).

Travail effectué partiellement au Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Lausanne (Directeur : Professeur P. Hauduroy), subventionné par le Fonds d'Etudes Roche (Bâle) et terminé à l'Institut Pasteur de Paris. (*Laboratoires de la Tuberculose.*)

#### BIBLIOGRAPHIE.

- [1] ANDREJEW (A.), ces *Annales*, 1946, **72**, 611.
- [2] LUTZ (A.), ces *Annales*, 1947, **73**, 1089.
- [3] LUTZ (A.) *Zeitschr. f. Vitaminforsch.* (Berne) [sous presse].
- [4] SANSONNENS, *Thèse Médecine*, Lausanne, 1946.



**SURINFECTION EXPÉRIMENTALE**  
**DE SUSPENSIONS PURES DE VIRUS VACCINAL :**  
**ACTION ÉLECTIVE DU BORATE DE PHÉNYL-MERCURE**  
**[SUR LES BACTÉRIES SAPROPHYTES**

par JOHN WIRTH et PASCU ATHANASIU.

(*Institut Pasteur. Service des Virus.*)

Les techniques modernes de cultures tissulaires permettent le titrage *in vitro* des suspensions de virus filtrants.

Les travaux les plus concluants dans ce domaine sont dus à Huang et à ses collaborateurs [1, 2, 3], qui ont travaillé avec des virus encéphalitogènes. D'autres chercheurs ont montré que les cultures tissulaires constituent un matériel particulièrement sensible à l'action des virus. Des suspensions virulentes sans action appréciable sur l'animal de laboratoire provoquent déjà des altérations pathognomoniques sur des cultures [4, 5, 6, 7, 8]. L'utilité de ce procédé de titrage provient de son économie en matériel et surtout des possibilités qu'il offre de travailler en campagne, loin de tout centre possédant des animaux de laboratoire [3]. Les milieux tissulaires peuvent être conservés de trois à douze mois dans un état de vie latente [3, 9], ce qui facilite encore les transports et le dépistage en campagne de zones présentant des virus.

Si la méthode des titrages sur cultures tissulaires n'est pas plus répandue, cela tient vraisemblablement à certaines difficultés qui paraissent devoir être bientôt surmontées.

D'une part, la technique classique de Carrel, avec son milieu plasmatique, ne convient pas aux titrages et aux colorations en série, aux cultures épithéliales. D'autre part, les échantillons renfermant des virus sont souvent lourdement contaminés de bactéries saprophytes, ce qui ne gêne pas le titrage sur animaux de laboratoire, mais constitue un inconvénient majeur lorsqu'on a affaire à des cultures cellulaires.

Les techniques modernes de cultures tissulaires [1, 3, 9, 10], évitent l'emploi du plasma, ce qui rend le traitement des cultures beaucoup plus facile.

Certaines manipulations permettent de séparer les virus des contaminations bactériennes. Entre autres, l'adjonction de désin-

fectants à action élective sur les bactéries a permis à certains auteurs d'obtenir des résultats intéressants. Hammon et Reeves [41], en particulier, ont souligné l'intérêt du borate de phényl-mercure dans leurs études sur le virus encéphalitique. La virulence de ces virus ne semble être aucunement diminuée par une concentration de 1/50.000 de ce désinfectant mercuriel, concentration qui est amplement suffisante pour éviter toute contamination bactérienne.

L'effet du borate de phényl-mercure a été étudié sur les cultures de fibroblastes [42], de cellules épithéliales et de macrophages [43]. Le produit est remarquablement bien toléré par les cellules tissulaires. Il existe une marge utilisable entre les concentrations toxiques pour les tissus et les concentrations bactéricides pour un même milieu.

Le fort pouvoir bactéricide du borate de phényl-mercure, sa toxicité relativement moins forte pour les tissus et son innocuité pour les virus encéphalitogènes rendent intéressantes des études plus détaillées de ce produit. Nous avons examiné son action sur des suspensions pures de virus vaccinal expérimentalement infectées avec des cultures bactériennes.

#### EXPÉRIENCES.

##### *Première série.*

A des mélanges à parties égales d'une suspension pure de virus vaccinal et d'une culture de staphylocoques blancs (origine : souris, bouillon de vingt-quatre heures au 1/10) ont été ajoutées des quantités de borate de phényl-mercure telles que pour une même quantité de virus et de staphylocoques, les dilutions du désinfectant soient de 1/40.000, 1/100.000, 1/200.000, 1/400.000, 1/800.000, 1/1.200.000 et 1/1.600.000. Les sept tubes ainsi qu'un tube témoin (virus et staphylocoques sans borate de phényl-mercure) ont été placés à l'étuve pendant quatorze heures. Un autre tube témoin est resté pendant ce temps à la glacière.

##### *Deuxième série.*

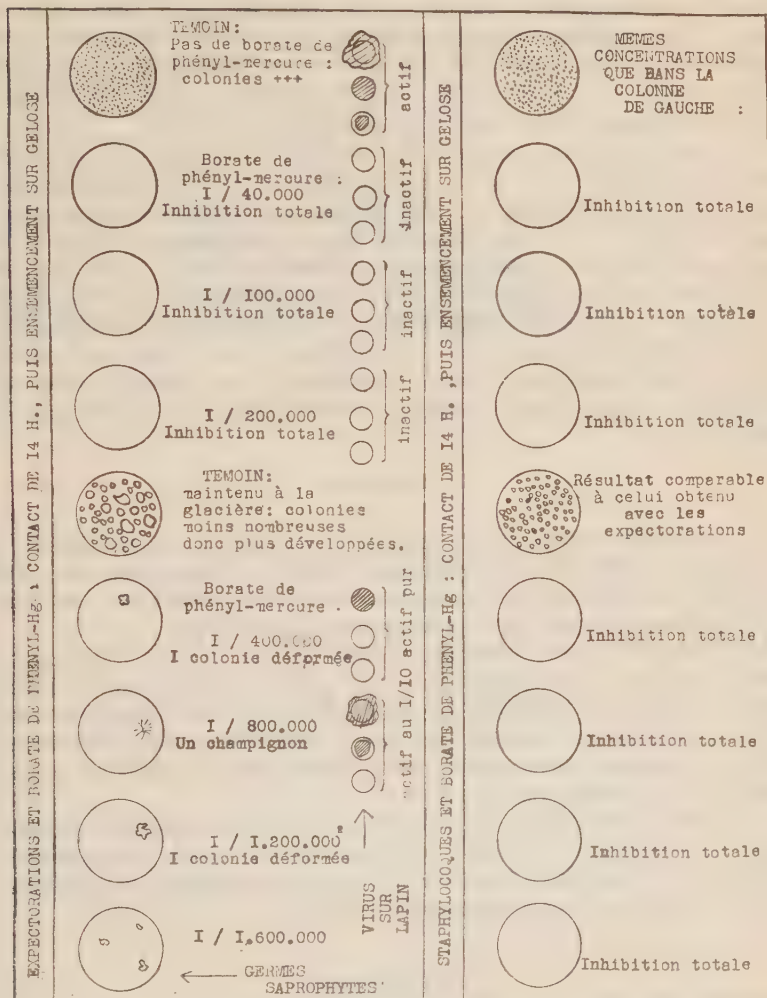
Une série parallèle, identique à la première mais surinfectée avec une dilution au 1/10 d'un échantillon d'expectoration d'un tuberculeux avec une flore saprophyte très riche, a également été mise à l'étuve.

#### RÉSULTATS.

1° *Action du borate de phényl-mercure sur le staphylocoque blanc.* — L'inhibition de ce germe par le sel mercuriel a été



totale jusqu'à la plus forte dilution utilisée (vérification sur gélose-bouillon dans des boîtes de Petri). Il est intéressant de constater que dans les tubes témoins une différence marquée existait entre



celui placé à l'étuve et l'autre maintenu à la glacière ; une prolifération intense avait eu lieu pendant les quatorze heures de séjour à l'étuve avec comme résultat des colonies microscopiques mais innombrables sur la gélose de la boîte de Petri. Dans le tube maintenu à la glacière, la richesse initiale en staphylocoques

s'était maintenue ; les colonies sur gélose ont donc été beaucoup moins nombreuses, par contre incomparablement plus développées.

2° *Action du sel mercuriel sur les germes saprophytes contenus dans l'expectoration.* — L'effet a été comparable à celui observé dans la série précédente, cependant dans les dilutions les plus fortes, une colonie de champignons s'est développée ainsi que trois colonies de cocci indéterminés, colonies à aspect macroscopique fortement altéré par l'action du désinfectant.

3° *Action du sel mercuriel sur le virus vaccinal.* — Certaines dilutions contenant le virus, le désinfectant et les germes provenant de l'expectoration ont été titrées sur lapins avec les résultats suivants : les tubes témoins (sans désinfectant) ont donné une forte réaction caractéristique à l'état pur et dilué au 1/10 et au 1/100. Le tube avec le borate de phényl-mercure au 1/40.000 n'a donné aucun résultat sur le lapin. Le tube avec le désinfectant au 1/400.000 n'a donné une réaction légère qu'à l'état pur, enfin l'échantillon renfermant le sel mercuriel à une concentration de 1/800.000 a provoqué la réaction caractéristique à l'état pur et dilué au 1/10.

#### DISCUSSION.

Il existe une marge utilisable (entre la concentration de 1/400.000 et celle de 1/800.000) où l'action du borate de phényl-mercure est appréciable sur le virus, mais non totalement virulicide. Ces concentrations sont, par contre, totalement bactéricides.

Ces résultats préliminaires permettent de prévoir une action très faible de ce désinfectant sur le virus vaccinal aux dilutions situées entre le 1/800.000 et le 1/1.600.000. Ces dilutions sont encore entièrement bactéricides sur le staphylocoque blanc utilisé et pratiquement entièrement bactéricides sur les germes saprophytes des expectorations.

Ces taux en borate de phényl-mercure sont très bien tolérés par les cultures tissulaires, ce qui laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ce produit lors du titrage de suspensions virulentes contaminées sur des cultures tissulaires.

#### CONCLUSION.

Le borate de phényl-mercure exerce une action nocive nette sur le virus vaccinal. Son action bactéricide est beaucoup plus marquée sur les staphylocoques blancs et les germes saprophytes provenant d'expectorations. Cette différence d'action peut utilement être mise à profit pour l'isolement des virus en cultures tissulaires.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] HUANG, *Proceed. Soc. Biol.*, 1942, **51**, 396 ; *Ibid.*, 1943, **54**, 158 ;  
*Ibid.*, 1943, **54**, 160 ; *J. exp. Med.*, 1943, **78**, 111.
- [2] SANDERS, HUANG et SIMMS, *J. Bact.*, 1943, **45**, 81.
- [3] SANDERS et HUANG, *Am. J. Publ. Health*, 1944, **34**, 461.
- [4] KAWAKITA, *Japan J. exp. Med.*, 1939, **17**, 211.
- [5] YAMAMURA et MEYER, *J. infect. Dis.*, 1941, **68**, 1
- [6] COX, *Proceed. Soc. exp. Biol.*, 1936, **33**, 607.
- [7] SANDERS, *Arch. Ophth.*, 1942, **8**, 581.
- [8] CURTH, CURTH et SANDERS, *J. Am. Med. Assoc.*, 1940, **115**, 445.
- [9] PARKER, *J. exp. Med.*, 1936, **64**, 121.
- [10] WIRTH et BARSKI, *Ces Annales*, 1947, **73**, 987 ; *Schw. Zeitschr. Path. Bakt.* (sous presse).
- [11] HAMMON et REEVES, *Proceed. Soc. exp. Biol.* 1945, **60**, 84.
- [12] WIRTH, *Schw. Zeitschr. Path. Bakt.*, 1945, **8**, 129.
- [13] PANG et ZIA, *Chin. Med. J., Suppl.*, 1940, **111**, 446.



# ETUDE QUANTITATIVE DU BACTÉRIOPHAGE DE LA MER

par A. GUELIN (\*).

(Institut Pasteur, Service du bactériophage et Station Biologique de Roscoff.)

La présence des bactériophages du groupe coli-typhique-dysentérique dans l'eau de mer a été signalée par plusieurs auteurs : Hauduroy (1923), Fernand Sempé et Chavanne (1925), d'Hérelle (1926), Arloing et Sempé (1926), Fejgin (1926), Fortunato (1928), Nyberg (1931), Gildemeister et Watanabe (1931), Gee (1932) et Tecce [1939] (1).

Arloing et Sempé ont obtenu des résultats négatifs dans la recherche des bactériophages à partir des échantillons prélevés trois mois auparavant dans la Mer Rouge et l'Océan Indien. Néanmoins, ils ont constaté sa présence dans le port du Havre. Seul, Davis (1933) n'a pas trouvé de bactériophage dans l'eau de mer, même après les baignades.

Jusqu'ici, l'étude des bactériophages dans l'eau de mer a été abordée exclusivement au point de vue qualitatif. Nyberg, en 1931 (2), a entrepris des recherches quantitatives des bactériophages dans les ports d'Helsinki, mais la méthode qu'il a appliquée (titrage du bactériophage après enrichissement) ne permet pas de tirer de conclusions.

Nous avons pensé que l'étude quantitative du bactériophage de l'eau de mer pouvait apporter des faits nouveaux et nous permettrait d'autre part, de vérifier et de confirmer nos recherches précédentes sur le rapport entre la quantité de bactériophage dans

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 Décembre 1947.

(1) HAUDUROY, *Bull. Inst. Océanogr.*, Monaco, 1923, n° 433, 1. — F. SEMPÉ et CHAVANNE, *Bull. Acad. Méd.*, 1925, 93, 184. — d'HÉRELLE, *Le bactériophage et son comportement*, Masson, 1926, 393. — ARLOING et SEMPÉ, *C. R. Soc. Biol.*, 1926, 94, 191. — FEJGIN, *Bull. Inst. Océanogr.*, Monaco, 1926, n° 484, 1. — FORTUNATO, *Centralbl. Ges. Hyg.*, 1928, 775 ou *Centralbl. Bakt. Ref.*, I, 1929, 92, 383. — NYBERG, *Centralbl. Bakt. Orig.*, I, 1931, 122, 270. — GILDEMEISTER et WATANABE, *Centralbl. Bakt.*, 1931, 122, 556. — GEE, Cité d'après ZO BELL, *Marine Microbiology*, U. S. A. 1946. — TECCE, *Riforma Med.*, 1938, n° 13 ; *Centralbl. Bakt. Ref.*, 1939, 133, 237. — DAVIS, Cité d'après ZO BELL, *Marine Microbiology*, U.S.A., 1946.

(2) NYBERG, *Centralbl. Bakt. Orig.*, I, 1931, 122, 270.

l'eau et le degré de pollution de cette eau (3). C'est pourquoi, au mois de Juin dernier, nous avons effectué une série d'études des bactériophages du groupe coli-typhique-dysentérique, dans un port de l'Océan Atlantique.

Pour les recherches quantitatives du bactériophage, nous avons employé notre méthode habituelle, qui consiste à définir la quantité minima d'eau, contenant du bactériophage décelable sur notre souche standard *B. Coli 36* (de F. M. Burnet).

Méthode. — 1° L'eau prélevée est mélangée à parties égales avec de l'eau peptonée (peptone sèche 60 g., NaCl 6 g., eau 1.000 cm<sup>3</sup>; précipitation à 120°; filtration; pH = 7,5; stérilisation).

2° Ce mélange est distribué dans une série de tubes à raison de 40, 20, 10 et 2 cm<sup>3</sup>, ce qui correspondra à 20, 10, 5 et 1 cm<sup>3</sup> d'eau à étudier. Dans les cas d'eau très polluée, on opère avec les dilutions à 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, etc.

3° Tous les tubes sontensemencés avec une suspension très jeune du *Bacterium Coli 36*. La suspension préparée est assez concentrée pour présenter, après l'ensemencement, 1.10<sup>8</sup> bactéries par cm<sup>3</sup>. Cet ensemencement abondant est indispensable pour que le départ de la culture ne soit pas devancé par le développement des bactéries de l'eau.

4° Les tubes sont portés à l'étuve pendant quatre heures. Ce court séjour à l'étuve est largement suffisant pour le développement du bactériophage et ne permettra pas la sporulation de certaines bactéries de l'eau; car la présence des spores serait très gênante pendant l'épreuve du bactériophage sur les plaques.

5° Après quatre heures d'étuve, la culture est chauffée au bain-marie à 56° C, pendant une demi-heure. Le chauffage élimine les bactéries devenues résistantes au bactériophage, ainsi que les bactéries de l'eau qui peuvent se développer pendant le court séjour de culture à l'étuve. La température de 56° C est suffisante pour la stérilisation des cultures en l'absence de spores et n'offre pas de danger pour le bactériophage après son enrichissement; les phages résistent en général très bien à cette température, surtout dans un milieu tel que l'eau peptonée. En admettant même qu'une partie des phages soit détruite à 56°, il en restera toujours suffisamment pour le déceler par la méthode de la goutte non étalée.

6° La culture est éprouvée en présence de *Bacterium coli 36*, sur une plaque de gélose à 1,5 % (0,01 cm<sup>3</sup> de culture à partir de chaque tube, sans étalement).

Si 20 cm<sup>3</sup> ont été nécessaires pour déceler le bactériophage, nous exprimerons ce résultat par le chiffre 1; s'il a fallu 10 cm<sup>3</sup>, par 2; 5 cm<sup>3</sup>, par 4; 1 cm<sup>3</sup>, par 20; 0,1 cm<sup>3</sup>, par 200, etc.

La quantité maxima d'eau prise dans nos recherches est toujours

(3) GUÉLIN et LE BRIS, ces *Annales*, 1947, 73, 508.

20 cm<sup>3</sup>. Il est évident qu'un résultat négatif dans 20 cm<sup>3</sup> n'est pas une preuve de l'absence totale du bactériophage dans cette eau, mais il indique au moins sa rareté.

Nous avons poursuivi les recherches quantitatives du bactériophage dans les différents points du vieux port de Roscoff (Finistère), afin de pouvoir comparer la contenance en bactériophage de ces eaux, par rapport à leur état sanitaire. Pour se rendre compte de la situation des points de prélèvements, nous reproduisons ici le schéma du vieux port, sur lequel les différents points sont indiqués par des lettres (fig. 1). Les maisons d'habita-

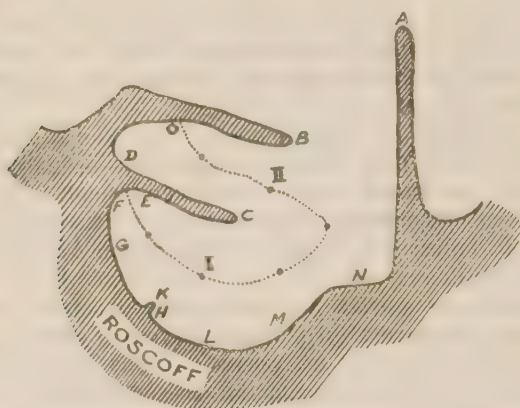


FIG. 1. — Schéma du Port de Roscoff.

tion sont concentrées aux abords immédiats du vieux port (I) qui est plus animé que le nouveau (II). Entre le phare (L) et la digue qui sépare les deux ports, une étroite plage de galets voisine avec la vase noirâtre qui couvre le fond de la baie. L'espace limité par les points F, G, II est, du point de vue sanitaire, nettement inférieur aux autres endroits du port. En face du phare, la mer reçoit un cours d'eau qui passe préalablement par la ville de Roscoff. Le point M représente une partie rocheuse qui est la plus déserte du port. Le point N est une petite plage sablonneuse et propre.

Dès les premières recherches, nous avons pu constater que le bactériophage du groupe coli-typhique-dysentérique est, en général, absent au large du port, mais très fréquent à proximité des côtes. Il se rencontre ici en quantités considérables, qui varient suivant l'état sanitaire des points de prélèvement. Ainsi, les lieux pollués par les habitats proches, par les baignades, etc., fournissent une eau plus riche en bactériophage (tableau I).

Nous nous sommes demandé à quelle distance de la côte on



TABLEAU I.

LETTRES correspondant au schéma	LIEU DU PRÉLÈVEMENT (marée haute depuis deux heures)	TENEUR de l'eau en bactériophages
A	Point terminal de la première digue . . . . .	0
B	Point terminal de la deuxième digue . . . . .	0
C	Point terminal de la troisième digue . . . . .	0
D	Escalier de la deuxième digue (barques des pêcheurs, net- toyage du poisson) . . . . .	20
F	Escalier de la troisième digue (barques des pêcheurs, net- toyage du poisson) . . . . .	20
G	Petite plage de galets. Mauvais état sanitaire . . . . .	2.000
H	Départ d'une petite digue pour la descente des barques . . .	200
K	Point terminal de la même petite digue . . . . .	4
L	Ancien phare. Passage d'un cours d'eau qui descend de la ville. . . . .	20
M	Partie rocheuse, la plus déserte du port (algues). . . . .	0
N	Plage sableuse; bon état sanitaire { avant les baignades. . . { pendant les baignades .	0 20.000

peut encore constater la présence des bactériophages du groupe intestinal. Cette fois, les prélèvements ont été faits en barque à différentes distances de la digue. Nous avons constaté qu'entre 10 et 20 mètres environ, le bactériophage a déjà complètement disparu (tableau II).

TABLEAU II.

LIEUX DES PRÉLÈVEMENTS (deux heures avant la marée haute)*	TENEUR en bactériophages
Escalier de la deuxième digue (F) . . . . .	20
A 5 m. de l'escalier . . . . .	20
A 10 m. de l'escalier . . . . .	20
A 20 m. de l'escalier . . . . .	0
Au milieu du port . . . . .	0

Comme nous l'avons indiqué sur le tableau I, les prises d'eau au large du port à partir des trois digues n'ont fourni aucune trace de bactériophage. Les recherches négatives obtenues avec l'eau prélevée aux différents endroits éloignés de la digue confirment nos observations (le trajet est indiqué sur le schéma par une ligne pointillée ; les prélèvements ont été faits deux heures après la marée haute). De même, ceux qui ont été effectués au large de l'Océan, en dehors du port, ne contenaient jamais de bactériophage coli-typhique-dysentérique. Est-ce par apport d'eau du large pendant la marée haute que s'explique la disparition du

bactériophage là où il avait été décelé auparavant ? (Tableau III).

La disparition du bactériophage au cours de la marée montante a été mise en évidence également par des prélèvements effectués à

TABLEAU III.

LETTRES correspondant au schéma	LIEUX DES PRÉLÈVEMENTS	TENEUR DE L'EAU en bactériophage	
		à marée basse	à marée haute
F . . . . .	Premier escalier de la troisième digue.	20	0
E . . . . .	Deuxième escalier de la troisième digue.	20	0

intervalles rapprochés pendant douze heures. De cette façon, nous avons pu suivre les variations des quantités de bactériophage au même endroit pendant le flux et le reflux. On voit ainsi le bactériophage apparaître en quantités considérables à marée basse et disparaître avec l'arrivée des eaux du large, pour réapparaître à nouveau quand la mer se retire (Tableau IV et fig. 2).

TABLEAU IV.

LETTRES correspondant au schéma	LIEUX DES PRÉLÈVEMENTS	TENEUR DE L'EAU EN BACTÉRIOPHAGE aux différentes heures de la marée (pleines mers, 1 h. 21 et 13 h. 51, basses mers, 7 h. 50 et 20 h. 19)						
		8 heures	10 heures	12 heures	14 heures	16 heures	18 heures	20 heures
E. . . .	Escalier de la troisième digue.	200	20	0	2	0	4	20
O. . . .	Escalier de la deuxième digue.	20	0	0	0	0	0	4

Au point de vue qualitatif, les eaux côtières contiennent des bactériophages actifs sur toutes les espèces du groupe intestinal, en commençant par les B. typhiques. Nous avons étudié quelques échantillons d'eau au point de vue quantitatif. La technique employée pour cela consistait à enrichir les phages de l'eau avec des bactéries (typhique Lister, paratyphique A. Kauffman, paratyphique B. Rouland, Coli 36, paradysentérique Y6R) ensemencés ensemble dans l'eau peptonée double avec de l'eau de mer à 1 : 1. Après six heures d'étuve, la culture est centrifugée. Le liquide surnageant est éprouvé sur 10 souches du groupe coli-typhique-

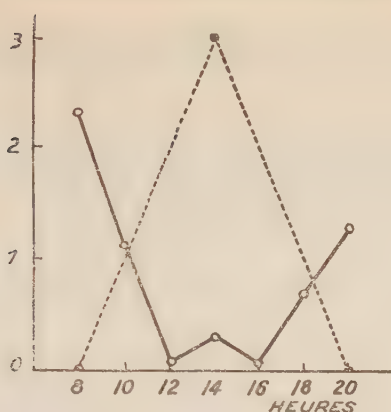


Fig. 2. — Teneur de l'eau en bactériophage (—) aux différentes heures de la marée (----).

dysentérique (un dixième de  $\text{cm}^3$  de liquide est déposé sur une boîte de géloseensemencée préalablement).

D'après les résultats obtenus (tableau V), nous constatons que les échantillons très riches en phages comme le 12 et le 27, sont aussi très polyvalents, puisqu'ils agissent sur tout le groupe colityphique dysentérique. Au contraire, les échantillons pauvres en phages (16, 37, 38, 33) sont toujours actifs sur moins d'espèces bactériennes. Ce qui, peut-être, s'explique par le fait que, lorsque le bactériophage est abondant, la probabilité de rencontrer des phages différents est plus grande. Néanmoins, on ne peut pas envisager ici de rapport direct entre la quantité de phages et la multiplicité de ses espèces, puisque les trois échantillons de même valeur en phages (43, 3 et 2), se distinguent nettement par les espèces bactériennes qu'ils attaquent.

Il semble que la polyvalence des échantillons dépende, dans une certaine mesure, de la proximité de la vase. Les prélèvements faits pendant la marée basse directement dans la vase, ou immédiatement au-dessus d'elle, étaient en général très polyvalents ; tandis que les prélèvements faits à la même place, mais à marée montante, à une certaine distance de la vase, possédaient une valence limitée.

Quel est le rôle joué par la vase dans le problème du bactériophage ? La présence, à proximité des côtes, des phages du groupe colityphique-dysentérique, est probablement due à l'apport constant des eaux d'égout, de pluies, des eaux d'infiltration ou à la pollution directe (animaux, baignades). La vase ne sert-elle pas de réservoir au bactériophage apporté du dehors ? Les prélèvements d'eau effectués à 50 cm. au-dessus de la vase et dans la



TABLEAU V.

NUMÉROS des prélèvements	LETTRÉS correspondant au schéma	TENEUR en bactériophages	B. TYPHIQUE Léster (11)	B. TYPHIQUE " 7 "	B. TYPHIQUE " 4 "	B. PARATYPHIQUE A Kaufman	B. PARATYPHIQUE A Arnica	B. PARATYPHIQUE B Rouland	B. <i>Coli</i> 36	B. PARADYSÉTIQUE YGR	B. SHIGA O	REMARQUES
12	F	2 000	+	+	—	+	+	+	+	+	—	Marée basse. Vase.
27	E	2.000	+	+	+	+	+	+	+	+	—	Marée basse. Vase.
26	O	20	+	+	—	+	+	+	+	+	+	Marée basse. 50 cm au dessus de la vase.
29	E	20	+	+	+	+	+	+	+	+	—	Marée basse. 1 m. au dessus de la vase.
43	L	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Marée haute. Présence d'un cours d'eau des- cendant de la ville.
3	F	20	—	—	—	+	+	+	+	+	+	Le reflux de la mer de puis 3 heures. Vase.
2	E	20	—	—	—	—	—	—	+	+	+	Le reflux de la mer de puis 3 heures.
13	F	20	—	—	—	—	—	—	+	+	—	Marée basse. 50 cm au dessus de la vase.
40	D	20	—	—	—	—	—	—	+	+	—	Marée basse.
41	F	20	—	—	—	—	—	—	+	+	—	Marée haute.
16	O	4	—	—	—	—	—	—	+	+	—	Le reflux de la mer de puis 3 heures.
37	E	4	—	—	—	—	—	—	+	+	—	Marée haute.
38	O	4	—	—	—	—	—	—	+	+	—	Marée haute.
33	F	2	—	—	—	—	—	—	+	+	—	Marée haute.

vase même, montrent que la quantité de phages est plus élevée dans cette dernière (tableau VI). Notons que nos observations sur

TABLEAU VI.

LIEUX DES PRÉLÈVEMENTS	TENEUR EN BACTÉRIOPHAGE	
	Vase	An dessus de la vase (50 cm.)
Point O. Marée haute . . . . .	20	2
Entre les points G et F. Marée basse . . . . .	2.000	20

la survivance des bactéries intestinales dans l'eau de mer, montrent que cette survivance se prolonge si l'eau est prélevée avec de la vase (tableau VII). En admettant que, dans certaines conditions, les bactéries sont capables de se multiplier dans la vase,

on en arrive à supposer que celle-ci non seulement est favorable à la conservation des phages, mais elle permet peut-être leur multiplication.

TABLEAU VII.

	SURVIVANCE DES BACTÉRIES (exprimée en p. 100)					
	0	1 jour	2 jours	3 jours	7 jours	30 jours
<i>B. typhique</i> Lister :						
a) Eau de mer prise au large.	400	—	66	29	10	0
b) Eau de mer avec la vase. .	100	—	56	39	10	0,9
c) Eau physiologique. . . . .	100	60	13	4	0	—
<i>B. para-dysentérique</i> Y6R :						
a) Eau de mer prise au large.	400	70	69	47	10	0
b) Eau de mer avec la vase. .	100	100	65	59	15	9
c) Eau physiologique. . . . .	100	21	2	0	—	—
<i>B. Coli 36</i> :						
a) Eau de mer prise au large.	100	100	66	62	50	0
b) Eau de mer avec la vase. .	100	84	91	77	41	6
c) Eau physiologique. . . . .	100	51	1	0	—	—

L'absence de bactériophage intestinal au large de l'océan, ne peut-elle pas s'expliquer par l'action nocive de l'eau, soit directement sur les phages, soit sur leurs bactéries sensibles ? Dans ce cas, la disparition des bactéries doit inévitablement influencer la quantité des phages de l'eau. D'ailleurs certains auteurs ont déjà indiqué l'action destructrice de l'eau de mer (surtout non stérilisée) sur les bactéries intestinales.

Dans nos observations, le bactériophage coli-dysentérique C 16 introduit dans l'eau de mer (autoclavée et non autoclavée), conservée à 6° C, garde entièrement son titre pendant la première semaine. Les bactéries (*B. typhique* Lister, paradysentérique Y6R et *Coli 36*) placées dans les mêmes conditions disparaissent progressivement dès le premier jour ; mais cette disparition est ralentie en comparaison de la disparition de ces bactéries dans l'eau physiologique. Après sept jours on peut encore déceler de 10 à 50 p. 100 des germes tandis que dans l'eau physiologique la disparition est totale vers le troisième jour (tableau VII). La survivance de *B. coli 36* dans l'eau autoclavée et non autoclavée, fraîchement prélevée au large, est pratiquement la même pendant les cinq premiers jours (tableau VIII). L'absence de bactériophage coli-typhique-dysentérique au large de l'océan ne semble pas pouvoir s'expliquer par l'action nocive des eaux marines.

TABLEAU VIII.

	SURVIVANCE DU <i>B. coli</i> 36 (exprimée en p. 100)					
	0	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	5 jours
Eau de mer autoclavée . . . . .	100	67	75-67	74-58	55-48	54-49
Eau de mer non autoclavée. . . .	100	83	78-77	77-63	—	59-55

En tenant compte du fait que le bactériophage est un satellite constant des bactéries, nous nous sommes demandé dans quelle mesure l'eau de l'Océan pouvait être polluée par les bactéries intestinales. Les ensemencements de l'eau prélevée au large de l'Océan ou au milieu du port (marée haute) sont restés parfois complètement stériles ; en tout cas, nous n'avons jamais constaté de colonies du groupe intestinal, tandis que les ensemencements des eaux côtières montrent la présence fréquente de ces germes. On peut donc supposer que l'existence du bactériophage du groupe coli-typhique-dysentérique, dans l'eau de l'océan, est déterminée par la présence des bactéries intestinales. Les variations de la quantité des phages par rapport à l'état sanitaire des lieux confirment les résultats de nos recherches précédentes, à savoir que la quantité de bactériophage intestinal correspond au degré de pollution de ces eaux par les bactéries intestinales.

Nous exprimons nos vifs remerciements à la Direction de la Station biologique de Roscoff qui nous a donné toutes les facilités pour accomplir notre travail.

#### CONCLUSIONS.

Les recherches quantitatives des bactériophages du groupe coli-typhique-dysentérique dans le port de Roscoff (Finistère) nous ont fourni les résultats suivants :

Les bactériophages n'ont pas été trouvés au large du port, mais ils sont très abondants à une faible distance des côtes habitées.

Leurs quantités varient suivant l'état sanitaire de l'endroit où l'échantillon a été prélevé. La pollution des eaux de mer par la proximité des habitats, par les baignades, etc., augmente la quantité du bactériophage.

Ces résultats confirment nos recherches précédentes, la quantité de bactériophage dans une eau correspond au degré de contamination bactérienne de cette eau.



# ACTION DE L'ACIDE *p*. AMINOBENZOYLGLUTAMIQUE ET DES OXYMÉTHYLPTÉRINES SUR *LACTOBACILLUS CASEI* (\*)

par Max VISCONTINI, RAYMOND GAVARD et JACQUELINE MILLET.

[Laboratoire de Chimiothérapie et Service des Fermentations  
de l'Institut Pasteur.]

Le rôle de l'acide folique en tant que vitamine ou facteur de croissance pose le problème fort étudié et plein d'intérêt de l'acide *p*.aminobenzoïque dont le rôle chimique et biologique vient d'être mis, pour la première fois, en évidence dans un corps bien déterminé.

Ce problème est le suivant : l'acide *p*.aminobenzoïque se borne-t-il à entrer dans la constitution de l'acide folique, ou bien possède-t-il d'autres propriétés biologiques non encore mises en évidence ?

Des expériences que nous rapportons, effectuées dans les limites de temps et de concentration données, il semble que cette première hypothèse puisse être vraisemblable puisque le développement du *Lactobacillus casei* que nous avons cultivé sur milieu synthétique n'est pas accru en présence de doses croissantes d'acide *p*.aminobenzoïque. Bien plus, de cette augmentation de concentration découlerait plutôt une légère inhibition (tableau IV).

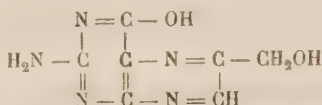
Un autre problème, également posé par l'entrée de l'acide *p*.aminobenzoïque dans la molécule d'acide folique, était de savoir si le *Lactobacillus casei* était capable de synthétiser ce dernier facteur de croissance à partir de certains constituants de sa molécule chimique. Il résulte de nos expériences que la souche de *Lactobacillus casei* que nous avons utilisée est incapable de faire cette synthèse à partir du benzoyl-glutamate d'éthyle, de la 2 amino-6-oxy-8-oxy-méthylptérine (1) ou de la 2 amino-6 oxy-9 oxyméthylptérine [3].

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 décembre 1947.

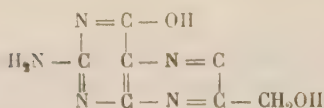
(1) La synthèse de ces deux corps sera décrite dans un autre périodique.

Ceci est en accord avec ce qui a été déjà signalé pour diverses autres ptérines par L. D. Wright et H. R. Skeggs [10] pour *Aerobacter*, *Aerogenes* ; par J. O. Lampen et M. J. Jones [4] pour *Lactobacillus arabinosus* et *Streptobacterium plantarum*, et enfin par L. J. Daniel, L. C. Norris, M. L. Scott et G. F. Heuser [1, 2] pour *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus arabinosus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

TABLEAU I.



2 amino-6-oxy-8-oxy méthylptérine.



2 amino-6-oxy-9-oxy méthylptérine.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE.

La souche de *Lactobacillus casei* est celle qui nous a été fournie aimablement par M. le professeur W. H. Peterson et qui provient de l'Université de Madison (Wisconsin).

Le milieu de culture dont nous nous sommes servi s'inspire de celui utilisé par Snell [5, 6, 7]. Voici sa composition et son mode de préparation.

#### Milieu pour un litre de culture.

##### Solution A :

Glucose. . . . .	20.000 g.
Caséine hydrolysée. . . . .	20.000 g.
Acétate de sodium. . . . .	20.000 g.
Tryptophane. . . . .	100 g.
Cystine. . . . .	100 g.
Uracile. . . . .	10 g.
Sulfate d'adénine. . . . .	25 g.
Guanine. . . . .	10 g.
PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> H. . . . .	2.500 g.
PO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> . . . . .	2.500 g.
Solution de sels. . . . .	20 cm <sup>3</sup>

La solution de sels renferme :

SO <sub>4</sub> Mg 7H <sub>2</sub> O. . . . .	10.000 g.
SO <sub>4</sub> Fe 7H <sub>2</sub> O. . . . .	500 g.
SO <sub>4</sub> Mn 7H <sub>2</sub> O. . . . .	500 g.
H <sub>2</sub> O bidistillée, quantité suffisante pour 250 cm <sup>3</sup>	

*Solution B (2) :*

Pantothénate de Ca . . . . .	5 mg.
Acide nicotinique . . . . .	5 mg.
Riboflavine (vitamine B <sub>2</sub> ) . . . . .	1 mg.
Pyridoxine (vitamine B <sub>6</sub> ) . . . . .	1 mg.
Aneurine (vitamine B <sub>1</sub> ) . . . . .	1 mg.
Acide p. aminobenzoïque (3) . . . . .	1 mg.
Biotine . . . . .	4 γ
Acide folique (3) . . . . .	4 γ

La solution A est amenée à pH 6,8 avec NaOH. 2N, complétée à 960 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bidistillée, filtrée à chaud sur Buchner et enfin stérilisée sur bougie Chamberland L<sub>3</sub>.

Pour la fraction B, les vitamines sont diluées dans 40 cm<sup>3</sup> d'H<sub>2</sub>O bidistillée stérile. On mélange B et A et on répartit dans des tubes stériles à raison de 10 cm<sup>3</sup> par tube.

On a utilisé soit un hydrolysate chlorhydrique de caséine, soit un hydrolysate sulfurique analogue à celui préparé par Snell [8]. Pour la préparation de l'Inoculum nous avons également suivi les prescriptions de E. E. Snell et F. H. Strong [9].

Les cultures ont été faites à 37° pendant dix-huit, vingt-quatre ou quarante heures, selon les expériences.

Le développement microbien a été suivi par mesures néphélométriques à l'électrophotomètre de Meunier en lumière orange.

Voici groupés dans les trois tableaux suivants quelques-uns des résultats les plus importants que nous avons obtenus :

TABLEAU II. — Température, 37°; durée, quarante heures.

TÉMOINS		MESURES néphélométriques
Milieu avec acide PAB [1.000 γ p. 1.000] (4) + acide folique (4 γ p. 1.000) . . . . .		760
Milieu avec acide folique seul (4 γ p. 1.000) sans PAB. . . . .		304
Milieu sans PAB, sans acide folique . . . . .		37
CONCENTRATIONS p. 1.000		MESURES néphélométriques
2.000 γ acide PAB glutamique (5). . . . .		—
500 γ	—	50
100 γ	—	66
20 γ	—	51
2.000 γ 2 amino-6-oxy-8-oxyméthylptérine. . . . .		56
500 γ	—	46
100 γ	—	36
20 γ	—	36
Somme des deux précédentes. . . . .		51
		59
		50
		51

(2) Nous tenons à remercier les Maisons Hoffman-La Roche, à Bâle, et Roche à Paris pour avoir mis tous ces produits à notre disposition.

(3) Dans le milieu renfermant ces facteurs de croissance.

(4) PAB : acide p-aminobenzoïque.

(5) PAB glutamique : benzoyl-glutamate d'éthyle.



TABLEAU III. — Température, 37°; durée, quarante heures.

TÉMOINS			MESURES néphélométriques
Milieu avec acide PAB (1.000 γ p. 1.000) + acide folique (4 γ p. 1.000) . . . . .			915
Milieu avec acide folique seul (4 γ p. 1.000) . . . . .			430
Milieu sans PAB (4), sans acide folique. . . . .			47
CONCENTRATIONS p. 1.000			MESURES néphélométrique
2.000 γ acide PAB glutamique (5). . . . .			55
500 γ	—	—	49
400 γ	—	—	29
20 γ	—	—	29
1.000 γ 2-amino-6-oxy-9-oxyméthylptérine. . . . .			74
200 γ	—	—	50
40 γ	—	—	50
8 γ	—	—	42
Somme des deux précédentes. . . . .			74
			49
			46
			41

TABLEAU IV. — Cultures de dix-huit heures à 37° (Néphélométrie).

ACIDE FOLIQUE γ pour 10 cm <sup>3</sup>	0	0,04 γ	0,2 γ	1 γ
Acide p. aminobenzoïque pour 10 cm <sup>3</sup> :				
0 . . . . .	30	66	59	95
0,1 γ . . . . .	35	66	45	82
0,5 γ . . . . .	30	44	41	74
5 γ . . . . .	27	54		76
10 γ . . . . .	28	49		62

## CONCLUSIONS.

D'après ces données il semble prouvé que la synthèse de l'acide folique ne peut être effectuée à partir de ses constituants ptérines, acide p.aminobenzoïque et acide glutamique.

On peut également penser que l'acide p.aminobenzoïque n'est que le précurseur de l'acide folique.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] DANIEL (J.), NORRIS (L. C.), SCOTT (M. L.) et HEUSER (G. F.).  
*J. Biol. Chem.*, 1947, **169**, 689.  
 [2] *Id.*, 1947, **170**, 747.

- [3] KARRER (P.), SCHWYSER (R.), ERDEN (B.), SIEGWART (A.). *Helv. chim. Acta*, 1947, **30**, 1031.
- [4] LAMPEN (J. O.) et JONES (M. J.). *J. Biol. Chem.*, 1947, **170**, 133.
- [5] ROBERTS (E. C.) et SNELL (E. E.). *J. Biol. Chem.*, 1946, **163**, 499.
- [6] SNELL (E. E.) et PETERSON (W. H.). *J. Bact.*, 1940, **39**, 773.
- [7] SNELL (E. E.). *J. Bact.*, 1945, **50**, 373.
- [8] SNELL (E. E.) et PETERSON (W. H.). *J. Bact.*, 1940, **39**, 273.
- [9] SNELL (E. E.), et STRONG (F. M.). *Indust. a. Eng. Chem., Anal. éd.*, 1939, **11**, 346.
- [10] WRIGHT (J. D.) et SKEGGS (H. R.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1944, **55**, 92.

## ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BACTÉRIOSTATIQUES DE LA CLITOCYBINE (\*)

par CHARLES RIVIÈRE, LOUIS et LÉONE SALOMON, MAURICE THIÉLY  
et GABRIEL GAUTRON.

La clitocybine, principe antibiotique découvert par le professeur Hollande [1, 2] dans le champignon *Clitocybe candida*, et dont nous venons, d'autre part, de publier une étude bio-chimique [3, 4], présente une activité bactériostatique étendue *in vitro*.

L'étude bactériologique que nous décrivons ici a été effectuée sur la fraction éthéro-soluble de nature hétérosidique [3].

Cette fraction hétérosidique de la clitocybine, titrant de 7.000 à 12.000 unités Oxford par gramme, ne contient, dans les échantillons titrant plus de 10.000 unités par gramme, aucune trace de C NH décelable par les réactions de Guignard, Thierry, et bleu de Prusse. Dans les échantillons moins purs, titrant environ 7.000 unités par gramme, ces méthodes permettent de déceler la présence de traces de C NH (0,0003 mg. de C NK par unité Oxford) que l'on peut d'ailleurs éliminer sous vide sans perte d'activité. Nous ne pouvons, en conséquence, considérer que l'action bactériostatique décrite ci-dessous soit imputable à la présence de C NH comme Locquin [5, 6] en a émis l'hypothèse. D'autres considérations exposées antérieurement viennent d'ailleurs confirmer cette façon de voir [4].

### ACTION BACTÉRIOSTATIQUE « IN VITRO » DE LA CLITOCYBINE.

Les germes suivants ont été inhibés, soit en bouillon (méthode Oxford), soit en milieu solide (méthode Heatley) : *Staphylococcus aureus* (souche Oxford).

En bouillon, l'inhibition est obtenue à la dilution de 1/400.000 (méthode Oxford) ; cette même dilution provoque en boîte de Petri (méthode Heatley) une auréole de 24 mm. La courbe représentative du diamètre de l'auréole stérile en fonction de la concentration en clitocybine, est une droite lorsqu'on porte en abscisse le nombre d'unités et en ordonnée les logarithmes du diamètre du cercle d'inhibition.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 décembre 1947.



Nous avons adopté comme unité d'action bactériostatique de la clitocybine, l'unité Oxford de la pénicilline qui inhibe la croissance du staphylocoque dans 50 cm<sup>3</sup> de bouillon.

	INHIBITION à la dilution de
<i>Eberthella typhosa</i> . . . . .	1/300 000
<i>Salmonella paratyphi</i> . . . . .	1/300.000
<i>Escherichia coli</i> . . . . .	1/300.000
<i>Brucella abortus</i> . . . . .	1/400.000
<i>Bacillus anthracis</i> . . . . .	1/300.000
<i>Streptococcus lactis</i> . . . . .	1/600.000
<i>Streptococcus pyogenes</i> . . . . .	1/800.000
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (souche S.A.P.C.) . . . . .	1/800.000

Une action bactériostatique semblable fut observée sur les germes suivants :

*Pasteurella avicida*.

*Malleomyces mallei* (bacille de la morve).

*Erysipelothrix rhusiopathiae* (bacille du rouget du porc).

*Mycobacterium tuberculosis*; var. *bovis* (souche A. 18 virulente).

Enfin sur un germe anaérobie, une action bactériostatique fut également constatée en bouillon : *Clostridium perfringens* est inhibé à la dilution de 1/400.000.

L'action antibiotique ainsi constatée est, soit *bactéricide* (Hollande [2]), soit *bactériostatique*; c'est principalement cette dernière action que nous avons étudiée.

Cette action bactériostatique est, en outre, mise en évidence de la façon suivante :

Une préparation de clitocybine à 20 U/O par centimètre cube est additionnée de divers germes aérobies ou anaérobies; après un contact de douze heures, ces préparations sont introduites dans les milieux de culture. Pendant un temps variant de douze à quarante-huit heures, selon la concentration en antibiotique, les milieux restent stériles, puis la multiplication des germes apportés par la solution de clitocybine intervient. Ce temps de latence correspond à la destruction à l'étuve de la clitocybine en milieu aqueux.

Cette rapide disparition de l'activité en milieu aqueux à 37° et les pollutions apportées par les liquides à doser, ont rendu, au cours de ce travail, les dosages Oxford en bouillon parfois difficiles à réaliser.

Par contre, en boîtes de Petri, on ne constate jamais, comme cela a lieu avec la pénicilline, de pollutions microbiennes à l'intérieur du cercle d'inhibition. Mais les germes qui se trouvent dans cette zone ne sont pas tués et sont encore capables, sur un nouveau milieu de culture, de se multiplier.

Par cette méthode (Heatley), les résultats sont constants et,

même si une destruction prématurée de la clitocybine intervient, les diamètres d'inhibition maximum sont aisés à mesurer.

Nous constatons donc ici une action spécifiquement bactériostatique s'exerçant indifféremment sur tous les germes essayés.

### *Techniques expérimentales.*

*Malleomyces mallei* (bacille de la Morve).

Les tubes de pomme de terre sont largementensemencés ; un carré de papier buvard stérile de 1 cm<sup>2</sup> est placé au milieu de la longueur du fragment de pomme de terre. Chaque jour, 11 gouttes d'une solution contenant 1 U/O par centimètre cube sont déposées sur le buvard. Dès le deuxième jour, la colonie jaune envahit les deux extrémités de la pomme de terre, une zone de 15 mm. autour du buvard reste stérile ; le troisième jour les extrémités sont brun chocolat et l'auréole se maintient autour du buvard jusqu'à la fin de l'expérience (six jours).

*Mycobacterium tuberculosis* (var. *bovis*).

La technique précédente a été utilisée, mais l'inhibition quotidienne de clitocybine a été poursuivie pendant deux semaines. Dans ces conditions nous avons constaté une action bactériostatique. (Le professeur Hollande [2] a montré, par une technique différente, que l'on pouvait également obtenir une action bactéricide sur le bacille de Koch.)

### ACTION DE LA CLITOCYBINE SUR LE VIRUS APHTEUX « IN VITRO ».

Vingt-quatre heures de contact avec une solution contenant 1 U/O par centimètre cube de clitocybine détruit la virulence du virus aphteux O (Vallée) au 1/100.

Les cobayes ayant reçu ce mélange virus-clitocybine de vingt-quatre heures n'étaient pas immunisés quinze jours après.

### ACTION DE LA CLITOCYBINE SUR QUELQUES INFUSOIRES.

M. le professeur Faure-Fremiet a bien voulu examiner avec nous l'action de la clitocybine (fraction protidique et fraction hétérosidique) sur les espèces suivantes (Collection du Laboratoire d'Embryogénie du Collège de France) :

*Didinium nasutum*, *Frontania leucas*, *Ophryoglena pectans*, *Paramecium caudatum*, *Stylonychia mytilus*.

Ces organismes ont montré une sensibilité à la clitocybine égale en moyenne à celle des germes microbiens énumérés plus haut.

Il suffit de 1/100 d'unité Oxford par centimètre cube, soit une concentration en poids d'extrait sec de la fraction hétérosidique égale à 0,001 mg. par centimètre cube pour entraîner la mort en

douze heures de ces divers infusoires (une action semblable fut également notée avec la fraction globulinique).

Par chauffage à 70°, la toxicité sur infusoires diminue considérablement et parallèlement à l'activité bactériostatique sur staphylocoques.

#### ACTION BACTÉRIOSTATIQUE *in vivo*.

A la dose de 40 U. O. pour un cobaye de 500 g., nos extraits de clitocybe entraînent une action antibiotique dans le sang et les tissus, décelable sur staphylocoques par les méthodes usuelles pendant six heures. A ce moment, le renouvellement de cette même dose de 40 U. O. provoque, dans les vingt-quatre heures, la mort de l'animal.

Etant donné la toxicité que présentaient encore nos extraits, malgré les fractionnements et purifications effectués, nous n'avons pu dépasser, sans accident toxique, la dose de 5 à 10 U. O. par jour pour un cobaye de 300 gr., à raison d'une piqûre toutes les trois heures. A ces doses, nous n'avons pu obtenir une action curative contre :

*Streptococcus* (sur souris), *Pasteurella* (sur cobayes), *Mycobacterium tuberculosis* var *bovis* [souche A. 18] (sur cobayes).

#### Technique expérimentale.

Quatre expériences furent faites portant chacune sur 10 cobayes tuberculisés et traités par la clitocybine et 5 cobayes tuberculisés témoins. L'inoculation a été faite par voie sous-cutanée de 0,001 mg. de culture sur Lœwenstein de bacille de Koch bovin A. 18 (Collection du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort). Le traitement a été poursuivi pendant trente à quatre-vingts jours, suivant les expériences, en injectant tous les deux jours en sous-cutané de 5 à 10 U. O. de clitocybine (fraction globulinique d'une part et fraction éthéro-soluble de l'autre).

L'évolution des lésions tuberculeuses s'est révélée identique au soixante-dixième jour chez les témoins et les traités, et la mort des animaux s'est produite aux mêmes époques (entre le soixante-dixième et le cent-trentième jour).

#### VIRUS APHTEUX *in vivo*.

#### Technique expérimentale.

A. — Quatre expériences ont porté chacune sur 3 cobayes traités par la clitocybine et 3 cobayes témoins non traités.

L'inoculation a été faite par voie intradermique de 1/4 de centimètre cube de virus aphteux O (Vallée) au 1/100.

Le traitement a été commencé simultanément à cette inoculation



et poursuivi à raison de deux injections par jour de 20 U. O. de clitocybine.

Dans ces conditions, nous avons constaté un retard dans l'apparition des aphtes pendant toute la durée du traitement. Ce retard s'est poursuivi pendant trois à cinq jours jusqu'à la mort des animaux qui s'est produite du fait de l'action toxique des extraits de clitocybe que nous utilisons.

B. — D'autre part, sur deux expériences de 2 cobayes traités et 2 témoins, nous avons constaté que l'arrêt du traitement au bout de trois jours, sur des cobayes sans aphtes primaires et ne présentant encore aucun des phénomènes toxiques signalés ci-dessus, entraîne une généralisation immédiate et totale.

C. — Dans deux expériences sur 5 cobayes traités et 5 cobayes témoins, afin d'éviter ces accidents toxiques, nous avons diminué la dose de clitocybine injectée : dans ces conditions, aucune action empoisonnante n'est plus constatée.

D. — Enfin, nous avons essayé une action curative de la clitocybine après l'apparition des aphtes primaires afin d'enrayer l'évolution ultérieure de cette affection. Aucun résultat positif n'a pu être enregistré.

En résumé, l'action positive obtenue dans certains cas de nos expériences, c'est-à-dire le retard ou la non-apparition des aphtes, n'a pu être maintenue en raison de la toxicité de la clitocybine.

### CONCLUSIONS.

*In vitro*, nous avons confirmé et précisé l'action bactériostatique de la clitocybine sur de nombreux germes Gram + et Gram — ou acido-résistants, aérobies ou anaérobies, et avons constaté son action antibiotique sur un virus et quelques infusoires.

*In vivo*, du fait de la toxicité de nos extraits, purifiés selon les techniques décrites, nous n'avons pu maintenir pendant un temps suffisant dans le sang de nos animaux d'expérience, le taux bactériostatique minimum vis-à-vis des divers germes essayés, et, par suite, aucun effet curatif n'a pu être enregistré.

Cependant, l'action favorable constatée dans l'arrêt de l'évolution de la fièvre aphteuse, et le fait de pouvoir communiquer l'activité bactériostatique au sang d'un animal d'expérience nous font penser qu'à doses plus élevées une action *in vivo* pourrait être constatée si des extraits moins toxiques que ceux dont nous nous sommes servis pouvaient être préparés. Toutefois, l'étude de cette toxicité que nous avons décrite d'autre part, et le parallélisme entre l'action toxique sur infusoires et l'action bactériostatique montrent que, selon toute vraisemblance, une importante partie de cette toxicité est due aux principes antibiotiques eux-mêmes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HOLLANDE (A. Ch.). *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **221**, 361.
- [2] HOLLANDE (A. Ch.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224**, 1534.
- [3] RIVIÈRE (Ch.), THÉLY (M.) et GAUTRON (G.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*  
Séance du 4 novembre 1947 (sous presse).
- [4] RIVIÈRE (Ch.), THÉLY (M.) et GAUTRON (G.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*  
Séance du 16 décembre 1947 (sous presse).
- [5] LOCQUIN (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 893.
- [6] LOCQUIN (M.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, Séance du 18 novembre 1947  
(sous presse).

## SUR LA PRÉSENCE ET LE DOSAGE DU RUBIDIUM DANS LES TERRES ARABLES

par GABRIEL BERTRAND et DIDIER BERTRAND.

Depuis la découverte du rubidium par Bunsen et Kirchhoff dans un résidu de lépidolithe dont on avait extrait la lithine [1] et, peu après, par Grandeau dans le salin de Betteraves [2], la présence du nouveau métal alcalin a été reconnue par les deux premiers savants dans plusieurs minéraux lithinifères et dans certaines sources dites *minérales*, et par le dernier dans 5 plantes sur 9 qu'il a analysées.

Il n'est pas surprenant, dans ces conditions, que l'on ait pensé à se servir du spectroscope pour analyser la terre arable et que l'on ait réussi à déceler dans plusieurs échantillons de celle-ci des traces de rubidium.

C'est ainsi qu'à la suite d'expériences basées sur l'examen direct des substances dont nous avons déjà fait mention [3], Hugh Ramage a trouvé que « le rubidium est très largement distribué dans les sols », mais il n'a fourni aucun renseignement sur l'origine de ses échantillons, leur nombre et la proportion de ceux qui ont donné un résultat positif.

Plus récemment, d'après le résumé d'un travail paru en japonais [4], Keize Hirai et Buichiro Takagi ont examiné au spectroscope 28 échantillons de sols ; parmi les métaux reconnus, le baryum, le lithium, le strontium, le titane et le vanadium étaient les plus fréquents ; mais il y avait aussi du rubidium dans certains échantillons.

Les nombreuses déterminations que nous avons effectuées en combinant les méthodes chimique et spectrographique au sujet du rubidium [5], déterminations d'après lesquelles ce métal alcalin existe sans exception dans toutes les plantes et dans toutes les parties des plantes, apportent une première démonstration de l'existence non seulement fréquente mais générale du rubidium dans le sol et dans les eaux, milieux où les plantes puisent les éléments métalliques de leur construction.

Nous avons entrepris de compléter cette démonstration par une étude directe, à la fois qualitative et quantitative, d'un certain nombre de sols d'origines diverses.

Le rubidium, comme le potassium, doit exister dans le sol à des états très différents, plus ou moins attaquables par l'eau, l'acide



carbonique et les sécrétions radicellaires ; ces états sont, en conséquence, d'un intérêt plus ou moins immédiat pour les plantes. Pour rechercher le rubidium et évaluer d'une manière déjà intéressante au point de vue de la physiologie végétale les proportions relatives dans des échantillons de sols dont nous disposons [6], nous avons opéré d'après la technique suivante.

20 g. de terre fine [7], séchée à l'étuve à 105°, ont été passés au four électrique dans une capsule de platine, à une température un peu au-dessous du rouge, pour incinérer les débris végétaux, les substances organiques du groupe de l'humus et déshydrater l'argile. Les cendres refroidies ont été additionnées peu à peu d'acide chlorhydrique en solution normale jusqu'à cessation d'effervescence ; on a ajouté 20 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique concentré (décanormal) et évaporé à sec au bain-marie, en remuant de temps en temps. Sur le résidu desséché, dans lequel la silice était pour la plus grande partie devenue insoluble, on a versé 20 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique concentré, chauffé au bain-marie en remuant avec un agitateur pendant une dizaine de minutes, puis laissé déposer et décanté la partie liquide à travers un filtre en recueillant le liquide jaune et limpide dans une fiole. La partie indissoute a été extraite de la même manière à cinq reprises différentes en employant chaque fois 20 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique concentré. L'expérience a montré que des extractions supplémentaires enlèvent encore des métaux alcalins à la terre, mais alors en quantités si minimes que les six premières extractions représentent à très peu près les proportions qu'il est intéressant de considérer dans le travail de prospection auquel nous nous sommes livrés.

Les 100 et quelques centimètres cubes de la solution acide filtrée sont évaporés à sec au bain-marie dans une capsule de platine et le résidu traité exactement comme nous l'avons décrit pour l'analyse de la partie soluble dans l'acide chlorhydrique d'une cendre végétale ou animale. Finalement, les métaux alcalins, étant passés en entier à l'état de chlorures, on soumet 10 mg. du mélange salin sec à l'examen spectrographique.

Comme dans le cas des matériaux d'origine biologique, nous donnons pour les sols, dans le tableau ci-joint, les quantités de potassium, de sodium et de rubidium que nous avons dosées. Les chiffres sont exprimés en milligrammes par kilogramme de terre séchée à 105°.

Nous avons trouvé ainsi des quantités dosables de rubidium dans tous les échantillons de sols que nous avons analysés, que ceux-ci proviennent de France (17 échant.), de Danemark, d'Italie, de Serbie, des rives du Nil ou du Niger.

Les proportions rencontrées sont comprises entre 0,2 mg. et 18,7 mg. par kilogramme de terre fine séchée à + 105°.

ORIGINE DES SOLS	K	Na	Rb
Puysaye (Yonne). Sable d'une aspergeraie . . . . .	350	42,5	0,20
Pantchevo, Banat (Serbie) . . . . .	1.395	29,5	0,70
Limon du Nil (près du Caire) . . . . .	615	345	0,82
Fontainebleau (Seine-et-Marne). Terre de bruyère . .	355	49	1,32
Malvergne n° 3 (Vendée). Terre de jardin potager . .	956	230	1,42
Binitze Laaland (Danemark) . . . . .	402	352	1,56
Versailles (Seine-et-Oise). Station de Recherches agro- nomiques . . . . .	680	92	1,69
Limon du Niger (pris à Ségon) . . . . .	364	88	1,69
Neuville, près Caen (Calvados) . . . . .	488	183	1,76
Eu (Somme). Eboulis du turonien . . . . .	584	145	1,82
Kebernès, près Quimper. Sur granulite . . . . .	665	101	1,86
Grignon (Seine-et-Oise). Ecole nationale d'Agriculture.	675	108	1,98
Malvergne n° 2 (Vendée) . . . . .	370	222	2,49
Beauvoisin n° 1 (Gard) . . . . .	625	182	2,80
Charbuy (Yonne) Terre forte . . . . .	980	124	2,99
Genolhac n° 1 (Gard). Granit désagrégé . . . . .	427	36	3,60
Versailles n° 1 (Seine-et-Oise). Station de Recherches agronomiques . . . . .	1.160	110	3,93
Institut Pasteur de Paris. Parcelle du jardin sans en- grais depuis vingt-cinq ans . . . . .	975	545	4,12
Heurteauville, près Rouen (Seine-Inférieure) . . . .	403	277	4,49
Malvergne n° 1 (Vendée). Verger . . . . .	770	73	4,70
Grignon. Ecole nationale d'Agriculture. Sans engrais depuis 1875. Profondeur de 0 à 20 cm . . . . .	1.800	122	4,86
Aquapendente (Italie). Vallée . . . . .	1.290	1.740	18,70

Les deux chiffres extrêmes sont plutôt exceptionnels. La proportion la plus faible provient du sol, très riche en sable, d'une aspergeraie, ce qui ne peut étonner, le sable n'étant pas susceptible de fournir du rubidium ni très capable d'en retenir venant d'une source extérieure. La proportion la plus forte, présente dans le sol de la vallée qui se trouve au bas de la ville d'Aquapendente, est au contraire extraordinairement au-dessus de toutes les autres; peut-être la terre de cette région renferme-t-elle quelque minéral, analogue à la lépidolithe étudiée par Bunsen et Kirchhoff, particulièrement riche en rubidium. En première approximation et d'après les autres échantillons analysés, les teneurs en rubidium des terres cultivées, sont restées comprises entre 1 et 5 mg. par kilogramme. Dans les mélanges complexes qui constituent les terres arables, le sable et la craie apparaissent comme des diluants du rubidium. Pour le reste, quelle que soit son origine, le rubidium accompagne approximativement le potassium, mais d'une manière qui n'est en rien proportionnelle.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Ann. Chim. Phys.*, 1862, **64**, 257-311.
- [2] *Ann. Chim. Phys.*, 1863, **67**, 155-236.
- [3] « *Nature* », 1929, **123**, 601-602 et 1933, **137**, 67.

- [4] *Bull. Sci. Fakultat Terkultura*, Kijusu Imp. Univ., 1937, **7**, 239-244, résumé dans : *Chem. Abstr.*, 1937, **31**, 8094.
- [5] Ces *Annales*, 1946, **72**, 416-424 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **219**, 325-327 ; 1946, **222**, 423-426 et 572-574.
- [6] Ces échantillons faisaient partie d'une collection du laboratoire ayant servi à d'autres recherches, telles que : Gab. BERTRAND et M. MOK-RAGNATZ : « Nickel et Cobalt dans la terre arable », *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **179**, 1566. — Gab. BERTRAND et L. SILBERSTEIN : « Soufre total dans la terre arable », *C. R. Acad. Sci.*, 1927, **184**, 1938. — Gab. BERTRAND et L. SILBERSTEIN : « Baryum dans la terre arable », *C. R. Acad. Sci.*, 1928, **186**, 477. — Didier BERTRAND : « Molybdène dans la terre arable », *C. R. Acad. Sci.*, 1940, **211**, 406 et « Vanadium dans la terre arable », *Bull. Soc. Chim.*, 1942, **9**, 133. De sorte que les résultats obtenus permettent de faire des comparaisons intéressantes.
- [7] Préparée à partir de terre recueillie entre la surface et 20 cm. de profondeur.

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

Séance du 4 décembre 1947.

---

## COMMUNICATIONS

### HOMOGENÉISATION DES CRACHATS ET CENTRIFUGATION DU BACILLE DE KOCH VIVANT EN VUE DE L'INOCULATION AU COBAYE

par F. TISON.

Une méthode biologique de recherche, si perfectionnée soit-elle, ne peut déceler les bacilles de Koch, là où il n'y en a pas.

Il appartient au laboratoire de pousser la technique, le plus près possible de la perfection, et au clinicien d'en interpréter les résultats avec discernement.

La sensibilité est la qualité principale des méthodes biologiques de recherches, mais la réponse plus tardive est souvent gênante pour les praticiens, car elle n'est plus « d'actualité » et ne s'intègre pas au tableau clinique, au moment même où elle revient du laboratoire. C'est pourquoi nous nous sommes efforcé d'augmenter la sensibilité et de raccourcir le délai de la réponse de l'inoculation au cobaye (1, 2, 3).

Le volume injectable à un animal est de 1 à 2 cm<sup>3</sup> au maximum de crachat dilué dans le sérum physiologique (2 à 4 cm<sup>3</sup>). Les inégalités de répartition des bacilles de Koch peuvent provoquer des résultats discordants (Davy, Kreis et J. Levaditi).

C'est pourquoi nous avons voulu concentrer au maximum les bacilles dans la plus petite quantité de produit injectable.

**FLUIDIFICATION.** — Nous avons recherché le procédé qui ne serait susceptible, en aucun cas, de modifier les caractères biologiques du bacille de Koch.

(1) Ces *Annales*, 1947, 73, 187.

(2) Ces *Annales*, 1947, 73, 684.

(3) Ces *Annales*, 1947, 73, 1024.



*La Soude* : ce corps chimique qui donne une excellente fluidification en vue du diagnostic optique, est mal supporté par le bacille de Koch. Une solution de lessive de soude à 15 p. 100, laissée vingt minutes à 37° au contact d'une quantité égale de crachats, ne donne qu'une fluidification imparfaite. Cependant ce traitement suffit à tuer les bacilles de Koch, dans 28 p. 100 des cas. Nous l'avons constaté au cours d'inoculations comparatives à 48 cobayes.

*La Papaïne* : la solution de papaïne à 10 p. 100, stérilisée par filtration sur bougie L3, et ajoutée au crachat à raison de 1 pour 5, a été préconisée par P. Sédallian et R. Carraz (4), pour l'homogénéisation à chaud, en vue du diagnostic optique. Nous avons constaté que même à 37°, une fluidification excellente est obtenue, car la papaïne dissout 2.000 fois son poids de fibrine. Nous avons vérifié par l'inoculation à l'animal, que même en dépassant largement les conditions d'usage courant, l'action de la papaïne n'altérerait en rien, la virulence des bacilles de Koch. C'est ainsi que des crachats ont tuberculisé le cobaye, après plus de dix-huit heures de contact à 37°. Mais si la papaïne n'est pas toxique pour l'animal à petites doses, par contre, le culot de centrifugation contenant des produits de digestion papaïnique, est localement assez mal toléré. Les lésions qui en résultent risquent d'inhiber à son début, une infection pauci-bacillaire.

*Le séjour à l'étuve* donne une fluidification satisfaisante, et Bezançon, Mathieu et Philibert avaient utilisé cette propriété pour leur méthode « d'enrichissement ». Nous avons déjà démontré que quatre jours d'étuve sont nécessaires pour que la prolifération des anaérobies dans le crachat tue le bacille de Koch. Encore faut-il que le récipient qui contient les crachats soit hermétiquement clos. On ne risque donc aucunement de léser les bacilles de Koch, par un séjour de vingt-quatre heures en vase ouvert, et ce temps est suffisant pour obtenir une fluidification, qui sera meilleure encore, si on a pris la précaution d'alcaliniser le pH par addition de 11 gouttes de soude à 15 p. 100, pour 5 cm<sup>3</sup> de produit.

**CENTRIFUGATION.** — Là aussi nous avons voulu vérifier en dépassant largement les conditions pratiques que le facteur accélération n'avait aucun effet nocif sur le bacille tuberculeux. Trois heures de rotation à 5.000 tours-minute n'altèrent pas sa virulence. Même dans ces conditions, un bon centrifugeur n'élève pas la température du liquide au delà de 30°. En pratique, vingt minutes de rotation à 3.000 tours suffisent.

**DESTRUCTION DES GERMES BANAUX.** — La pénicilline G, additionnée à raison de VI gouttes de la solution à 5.000 U. O. par centimètre cube, pour 1 cm<sup>3</sup> de culot de centrifugation, détruit en deux heures de contact tous les germes banaux, sans nuire au bacille de Koch. Le réajustement préalable du pH à la neutralité, en présence d'une goutte de tournesol, favorisera l'action de l'antibiotique et entraînera une meilleure tolérance à l'inoculation de la part du cobaye.

(4) Ces Annales, 1947, 73, 398.

LA TECHNIQUE. — Les expériences relatées nous ont amené à appliquer la technique suivante :

a) Fluidification : à l'étuve, de 5 cm<sup>3</sup> de crachats additionnés de 11 gouttes de soude à 15 p. 100 (vingt-quatre heures).

b) Centrifugation : après addition d'environ dix volumes d'eau distillée (vingt minutes à 3.000 tours-minute).

c) Neutralisation du culot, en présence d'une goutte de tournesol, et addition de VI gouttes de pénicilline G par centimètre cube.

d) Inoculation au cobaye : injection rendue facile, le produit étant exempt de fragments qui refusent ordinairement de traverser l'aiguille.

Cette préparation semble particulièrement intéressante au moment où, grâce aux travaux de Dubos, le cobaye est sur le point d'être remplacé par la souris en tant qu'animal de choix.

(Laboratoire central des Villages-Sanatoriums de haute altitude,  
Praz-Coulant, Haute-Savoie.)

## PREMIER CAS CHINOIS DE MALADIE D'AUJESZKY

par Y. CH. LIEOU et C. C. KOUO.

La maladie d'Aujeszky, entité morbide décrite pour la première fois en Hongrie en 1902 (1) et dont l'existence a été démontrée depuis dans beaucoup de pays (2), n'a jusqu'à présent, croyons-nous, pas encore été signalée en Chine, ni même peut-être en Asie orientale, le premier cas asiatique ayant été rapporté en Asie mineure (3).

Voici dans quelles circonstances nous avons été amenés à isoler un virus de cette maladie chez un chat à Changhaï.

I. DONNÉES CLINIQUES D'APRÈS LES RENSEIGNEMENTS FOURNIS PAR LA PROPRIÉTAIRE DU CHAT MALADE ET PAR LE VÉTÉRINAIRE AYANT OBSERVÉ CE CHAT. — M<sup>me</sup> O. L..., Russe, résidant dans le quartier central de Changhaï, remarque le 5 janvier 1947 que son chat est atteint de troubles digestifs : vomissements répétés et diarrhée. Etat stationnaire les jours suivants. Le 7 janvier 1947, l'animal présente une sialorrhée abondante et de l'inquiétude dans le regard. M<sup>me</sup> O. L..., en le manipulant, est mordue à la main droite (petite morsure, très superficielle). Elle se soumet aussitôt au traitement antirabique. Le 8 janvier, un voisin à qui elle demande de l'aider à immobiliser cet animal, est également mordu aux deux mains, ce qui motive pour lui aussi un traitement antirabique. Le même jour, le chat est envoyé chez le vétérinaire B... qui note, outre une salivation abondante, une parésie du train postérieur. L'animal meurt dans la nuit du 8 au 9 janvier.

(1) A. AUJESZKY, *Zentralbl. Bakt.*, 1902, 353.

(2) P. REMLINGER et J. BAILLY, *La maladie d'Aujeszky*, 1938, 8 (Masson et Cie, édit.).

(3) ZEKAI MUAMMER TUNÇMANN, *Bull. Acad. Méd.*, 1937, 418, 240.

Diagnostic clinique porté par le vétérinaire : rage. Pour confirmation, la tête de l'animal est envoyée à l'Institut Pasteur de Changhaï.

II. RÉSULTAT DES EXAMENS DE LABORATOIRE. — a) *Examen histopathologique.* — La corne d'Ammon de ce chat est traitée suivant la technique histologique utilisée depuis 1942 à l'Institut Pasteur de Changhaï (4) : fixation des pièces dans le liquide de Zenker, inclusion dans la paraffine, coloration des coupes par la méthode de Lépine (5).

Les préparations ainsi traitées montrent de l'infiltration leucocytaire autour des vaisseaux et de la neuronophagie, ce qui indique nettement la nature inflammatoire de la maladie. En outre, on constate des inclusions oxyphiles de forme arrondie ou ovale ressemblant tout à fait aux corps de Negri : ayant un diamètre variant de  $4.5\mu$  à  $2.3\mu$ , ils sont colorés en rouge et se trouvent à l'intérieur du protoplasme des cellules. Il existe enfin d'autres éléments arrondis également oxyphiles, de dimensions plus petites ( $1.2\mu$ ) et qui sont extra-cellulaires ; on en trouve même dans des capillaires.

b) *Inoculations expérimentales.* — Le 13 janvier nous inoculons par voie intracérébrale un lapin (lap. 91) avec du bulbe rachidien du chat suspect, bulbe conservé en glycérine à  $+5^{\circ}$  depuis le 9 janvier 1947 (un quart de centimètre cube d'une émulsion à 1 p. 100 de substance nerveuse dans de l'eau physiologique). Le 16 janvier ce lapin meurt. Faute d'une observation soutenue, nous ne pouvons décrire les signes présentés par cet animal avant sa mort. Néanmoins, après vérification de la stérilité de l'encéphale et du sang du cœur de cet animal sur milieux aérobies et anaérobies, un autre passage est pratiqué à partir du bulbe du lapin 91 dans le cerveau d'un second lapin (lap. 92) le 27 janvier 1947. En même temps, avec le reste du bulbe du chat, on fait une inoculation intradurale à un autre lapin (lap. 93).

Le lapin 92 meurt d'une façon foudroyante (vingt-deux heures après l'inoculation expérimentale). Comme signes cliniques, en dehors d'une certaine angoisse chez l'animal avant de mourir, on ne peut rien noter de particulier.

Deux autres lapins (lap. 94 et lap. 95) sont inoculés le 10 février 1947 toujours par voie intracérébrale, respectivement avec le bulbe rachidien du lapin 91 et avec celui du lapin 92. Le lapin 95 (inoculé avec le bulbe du 92) meurt vingt-deux heures après l'inoculation comme le lapin 92. Le lapin 94 (inoculé avec le bulbe du 91) devient manifestement malade dès le surlendemain (12 février 1947) : il ne mange plus, montre une certaine inquiétude et présente une salivation abondante. L'après-midi, il porte souvent les deux pattes antérieures sur le front, comme pour se débarrasser de quelque chose qui le gênerait ; puis, avec ses pattes postérieures, l'animal se gratte furieusement la tête, spécialement le côté où se situe le point d'inoculation. Les accès de grattage furieux se rapprochent de plus en plus et finissent par ne laisser aucun repos à l'animal. Jusqu'au soir, on ne remarque pas

(4) J. RAYNAL, Y. Ch. LIEOU et C. C. KOUO, *Etudes sur la rage*. Monographie de l'Institut Pasteur de Changhaï, 1946, 12 (Imprimerie de Tou-Sè-Wè, Changhaï).

(5) P. LÉPINE, in C. LEVADITI et P. LÉPINE, *Les ultravirus des Maladies humaines*, 1938, 1101 (Maloine) ; *id.*, C. R. Soc. Biol., 1935, 119, 804.



de parésie nette des quatre membres. Le lendemain matin, le 13 février 1947, l'animal est trouvé mort dans la cage, couché sur le côté droit.

Avec le bulbe rachidien de ce lapin (lap. 94) on inocule, le 18 février 1947, un lapin (n° 96) par voie intraoculaire (2/10 de centimètre cube d'une émulsion de 1 % dans l'eau physiologique) et un autre lapin (n° 98) par scarification sur la peau rasée du dos (2/10 de centimètre cube de la même émulsion étalée sur peau scarifiée). Le lapin 96 est mort le 20 février 1947 et le lapin 98 le 23 février 1947, après avoir présenté un prurit intense au niveau de la région inoculée, l'animal se grattant furieusement sans arrêt avant de mourir.

L'examen histopathologique d'un ganglion spinal du dernier lapin montre les lésions cellulaires suivantes : disparition de la substance de Nissl, coloration acidophile du protoplasme et envahissement de granulations acidophiles dans le noyau dont le nucléole se trouve très altéré ou a complètement disparu.

III. DISCUSSION. — a) *De quelle maladie est mort le chat ?* — D'après les données cliniques fournies par la propriétaire et complétées par le vétérinaire, il paraissait s'agir d'un cas de rage chez le chat à l'origine de cette observation. Le vétérinaire, qui a une grande expérience de la rage des animaux domestiques, était assez affirmatif à ce sujet. La présence d'inclusions oxyphiles intracellulaires dans des préparations histo-pathologiques pourrait également servir d'appui à ce diagnostic. Mais nous savons que chez le chat normal, on peut rencontrer des formations dans la corne d'Ammon prêtant à confusion avec les corps de Negri véritables (6). D'autre part, on constate dans notre cas des éléments (infiltration périvasculaire et neuronophagie) que généralement on ne voit pas dans la rage avec autant d'intensité, d'où la nécessité de recourir à des inoculations expérimentales.

Chez les deux premiers lapins inoculés, bien que, en raison de l'évolution foudroyante, on n'ait pu noter de signes pathognomoniques d'une maladie caractérisée, l'incubation très courte (1-3 jours) nous amenait à envisager la possibilité d'une maladie d'Aujeszky. Les passages ultérieurs montrant le prurit caractéristique de cette maladie transforment cette possibilité en probabilité (7). Celle-ci devient même quasi-certitude par suite de l'examen anatomo-pathologique d'un ganglion spinal du lapin 98 inoculé par scarification de la peau ; des cellules nerveuses de cet organe sont en effet atteintes de lésions semblables à celles décrites par Weston Hurst (8) comme spécifiques de la maladie d'Aujeszky. On peut donc dire que le chat est mort de la maladie d'Aujeszky malgré l'absence de tout prurit chez cet animal (d'après les déclarations de la propriétaire et du vétérinaire).

b) *Comment ce chat a-t-il pu être contaminé ?* — A cette question, on ne peut répondre que par des hypothèses. D'après des renseignements donnés par la propriétaire, deux semaines avant la maladie du chat, un autre chat paraissant malade serait entré dans la maison.

(6) NEGRI-LUZZANI, ces *Annales*, 1913, 27, 1039.

(7) On peut exclure toute possibilité d'une affection causée par bactéries pathogènes, le cerveau de chaque passage s'avérant stérile sur les milieux aérobie et anaérobie.

(8) WESTON HURST, *J. exp. Med.*, 1933, 58, 416.



D'autre part, depuis quelque temps, il y aurait eu beaucoup de rats morts dans le voisinage immédiat. Une enquête épidémiologique serait très intéressante. Nous proposerons de la mener si les circonstances le permettent.

IV. RÉSUMÉ ET CONCLUSION. — 1° L'examen de l'encéphale d'un chat mort après cinq jours d'une affection ressemblant à la rage a donné lieu :

a) Aux constatations histopathologiques suivantes : inclusions intracellulaires oxyphiles, infiltration périvasculaire et neuronophagie.

b) Aux inoculations au lapin, par passages en série, avec prurit caractéristique et issue fatale en très peu de temps : vingt-deux à soixante heures par voie intracérébrale, cinq jours par scarification de la peau ; dans le ganglion spinal d'un lapin mort après l'inoculation par cette dernière voie, on constate les lésions cellulaires décrites par Weston Hurst dans la maladie d'Aujeszky.

2° Ces faits nous autorisent à poser le diagnostic de maladie d'Aujeszky et, par conséquent à signaler, pour la première fois, l'existence de cette maladie en Chine.

(Institut Pasteur de Changhaï.)

## UN CAS D'INFECTION A *SALMONELLA THOMPSON*

par M<sup>me</sup> J. GRABAR et L. LE MINOR.

Le 27 septembre 1946, le professeur Mollaret nous adresse un prélèvement de sang d'un de ses malades, afin d'y pratiquer un séro-diagnostic. Voici le résumé de l'observation qu'il a bien voulu nous communiquer : le Dr B... Maurice, 39 ans, présente, à partir du 24 août 1946, au retour d'un voyage en Savoie, une asthénie croissante avec torpeur, anorexie et quelques frissons. La température s'élève à 40°3 le 26 août, en même temps que se surajoutent céphalée, douleurs articulaires et musculaires, hyperesthésie cutanée, insomnie et cauchemars. Le diagnostic porté au début est celui d'une leptospirose à forme méningée. Mais dans un second temps apparaît un ictère intense avec légère albuminurie ; la température persiste élevée ainsi que l'asthénie, malgré l'administration de pénicilline (500.000 unités par jour pendant trois jours) ; après une évolution par poussées successives dont la plus intense se situe le 13 septembre, se produit une sédation des signes fonctionnels, puis de la fièvre. Convalescence lente, mais sans incidents. Aucune séquelle à un an de distance.

Voici le résultat du séro-diagnostic dissocié pratiqué le 27 septembre 1946 : Eberth O 1/100. Eberth H 1/100 (agglutinats très fins), Para A et B (O et H) négatif. Le sérum n'a malheureusement pas été examiné vis-à-vis d'une suspension de *Salmonella paratyphi* C. Comme le malade était alors guéri et qu'il avait autrefois été vacciné, ce qui pouvait expliquer les agglutinations vis-à-vis des suspensions de bacilles d'Eberth, nous avons demandé un échantillon de selles pour tenter

d'isoler une *Salmonelle* pathogène. Le 2 octobre 1946, la culture sur milieu au vert brillant de Kristensen permit d'isoler un germe dont voici les caractères :

Bacille Gram négatif, mobile, ne liquéfiant pas la gélatine, ne fermentant ni le lactose, ni le saccharose, mais fermentant avec gaz le glycérol, le xylose, l'arabinose, le glucose, la mannite, la dulcité et le maltose. Le rouge neutre était réduit, le germe produisait de l'H<sub>2</sub>S et poussait sur les milieux au tartrate et au citrate de soude. Biologiquement, il s'agissait donc d'une *Salmonelle*. L'agglutination sur lame dans les sérums polyvalents de l'Institut Pasteur n'était positive que dans le sérum anti-para C et morphologiquement granulaire, du type O. Ce germe agglutinait de plus dans le sérum anti O VI-VII, et particulièrement dans le sérum O VI-VIII. L'agglutination dans le sérum H non spécifique 1,5 était immédiate. Nous nous trouvions donc en présence d'une *Salmonelle* du groupe C ayant comme antigène O VI-VII et comme H non spécifique 1,5. L'agglutination vis-à-vis des sérums anti c, anti d, anti g m, anti m t, était négative. Par contre, l'agglutination dans les sérums anti k et anti r était positive. Ces deux derniers sérums II provenaient de l'Institut sérothérapique danois. Nous ne pouvions tenir compte de l'agglutination dans le sérum anti r, plusieurs souches ne possédant pas l'antigène r s'y agglutinant. Par contre, le sérum anti k était spécifique, ce qui permit de déterminer la souche comme une *Salmonella* Thompson.

Nous avons préparé un sérum agglutinant en injectant à un lapin la souche vivante. L'agglutination en tubes donne le titre de 1/400 vis-à-vis d'une suspension O de *Salmonella* Thompson de collection, 1/200 vis-à-vis d'une suspension de para C O et 1/100 vis-à-vis d'une suspension de la souche O 901. Ces résultats confirment le diagnostic et permettent d'ajouter à la formule antigénique le facteur XII comme le montre l'agglutination vis-à-vis de la suspension O 901. En effet, le sérum saturé avec une suspension de la souche O 901 chauffée deux heures à 100° n'agglutine plus qu'avec des germes du groupe C.

La *Salmonella* Thompson a été décrite pour la première fois par Scott en 1926. Kaufmann en 1931 décrit la variation Berlin qui ne contient pas de phase spécifique. Les 2 types provoquent des gastro-entérites après ingestion de viandes contaminées par ce germe. A notre connaissance, c'est le premier cas décrit en France d'infection à *Salmonella* Thompson.

(Institut Pasteur.)

## ESSAIS DE CULTURE DE BK DANS LE MILIEU DE DUBOS

par J. VALTIS, F. VAN DEINSE et J. SOLOMIDES.

R. J. Dubos (1) a imaginé un milieu liquide pour la culture du BK, constitué de la façon suivante :

(1) R. J. Dubos, *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 409.

Asparagine . . . . .	1 g.
Phosphate disodique . . . . .	6,3 g.
Phosphate monopotassique . . . . .	1 g.
Citrate trisodique . . . . .	1,5 g.
Eau distillée . . . . .	1.000 cm <sup>3</sup>

Faire dissoudre et ajouter :

Sulfate de Mg . . . . . 0,6 g.

Le pH de cette solution oscille entre 6,4 et 7,5; il est inutile de l'ajuster.

On ajoute ensuite le « Tween 80 » à raison de 5 cm<sup>3</sup> d'une solution dans l'eau distillée à 10 p. 100.

Le « Tween 80 » est un lipide soluble dans l'eau et fait partie d'une série d'esters d'acides gras à longue chaîne, utilisés dans l'industrie en raison de leur influence sur la tension superficielle.

Le milieu ainsi préparé est réparti en tubes de 22 à raison de 10 cm<sup>3</sup> par tube, puis stérilisé à l'autoclave à 120° pendant 15 à 30 minutes.

Le milieu une fois refroidi, on ajoute de l'albumine sérique bovine desséchée (« sérum fraction 5 ») à raison de 0,1 à 0,3 p. 100, c'est-à-dire 5 g. de protéine dissoute dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau distillée; on ajoute 2 g. de NaCl, et on chauffe à 56° pendant 1/2 heure. Après filtration sur bougie Chamberland L<sub>3</sub>, on ajoute 0,5 cm<sup>3</sup> de cette solution dans 10 cm<sup>3</sup> de milieu.

Dubos insiste sur le fait qu'il est essentiel de ne pas garder longtemps le milieu contenant en même temps le « Tween 80 » et la « fraction 5 ». Le mieux est de préparer le milieu immédiatement avant l'utilisation.

D'après Dubos, le « Tween 80 » permet le développement diffus, homogène, de la culture de BK, et la « fraction 5 » facilite grandement le départ précoce de celle-ci et possède en même temps un pouvoir neutralisant sur l'action toxique des acides gras à longue chaîne sur le BK.

Dubos, en ensemençant dans ce milieu des doses de B. aviaires ou humains de 10<sup>-7</sup> mg., obtient un développement visible à partir du huitième au onzième jour. La culture se présente alors sous forme d'un trouble homogène, sans formation de voile à la surface. Les bâcilles, dans ces cultures, ont l'aspect de bâtonnets acido-résistants lisses, sans granules, tout au moins dans les cultures jeunes. Des cultures typiques homogènes ont été obtenues par Dubos, après ensemencement de son milieu avec des crachats humains tuberculeux (traités par de la soude) ou de fragments d'organes d'animaux tuberculeux.

Nous avons voulu, de notre côté, essayer ce milieu que nous avons préparé selon les indications de l'auteur (2). Nous avons, à plusieurs reprises, ensemencé dans ce milieu liquide des suspensions de BK bovins ou humains aux doses de 0,1 à 0,01 mg. D'autre part, nous y avons ensemencé des BK pris sur des cultures sur pomme de terre glycinée, émulsionnées préalablement dans le milieu de Dubos. Dès le cinquième jour, nous avons observé un développement sous forme de dépôt, laissant clair le liquide surnageant. En agitant le tube à ce

(2) Le « Tween 80 » nous a été gracieusement envoyé, à notre demande, par la « Atlas Powder Cy » à Wilmington (U. S.), ainsi que la « fraction 5 » par « Armour et Cy » de Chicago, que nous tenons à remercier ici.

moment, on voit se lever un trouble léger non homogène, granulaire. Mais à partir du huitième jour, l'agitation du tube provoque un trouble homogène laiteux. Sans agitation, la culture reste sous forme de dépôt glaireux au fond du tube. Ce n'est qu'exceptionnellement que la culture se développe d'emblée sous forme d'un trouble homogène. Réensemencée sur le même milieu, la culture se développe de la même façon, et réensemencée sur milieu à l'œuf de Löwenstein, elle donne naissance à des cultures microscopiquement typiques. Au microscope, les BX cultivés dans le milieu de Dubos se présentent en amas composés de BK acido-résistants granulaires de forme plutôt courte.

Par contre, l'ensemencement d'organes de 3 cobayes tuberculeux dans plusieurs tubes de ce milieu n'a donné aucune culture. Ces ensemencements ont été pratiqués directement par prélèvement stérile de fragments de rate et de ganglions, sans aucun traitement. Cependant, l'ensemencement de ces mêmes organes sur milieu de Löwenstein a donné naissance à des cultures abondantes de BK.

P. Hauduroy et W. Rosset (3) ont été les seuls en Europe, à notre connaissance, qui aient essayé ce même milieu jusqu'ici, et ces auteurs n'ont pu confirmer les résultats de Dubos en ce sens que leurs cultures n'étaient pas homogènes, à l'exception du B. aviaire qui, en quarante-huit heures, leur a donné des cultures homogènes très abondantes. Les B. bovins et humains ont donné, entre leurs mains, des cultures granulaires, ou exceptionnellement très légèrement homogènes, difficilement repiquables. Il est à noter que ces auteurs n'ont pas eu à leur disposition la « fraction 5 », qu'ils ont remplacée par du sérum de mouton ou de bœuf chauffé pendant trente minutes à 55°.

*Conclusion.* — D'après nos expériences, le milieu de Dubos se prête à la culture précoce du B. bovin et humain. Mais jusqu'ici, nous n'avons pas réussi à obtenir des cultures sur ce milieu en partant d'organes tuberculeux. D'autre part, la culture dans ce milieu ne se présente pas sous forme homogène, à de rares exceptions près. Toutefois, l'un de nous s'en est servi avec succès pour le titrage de certains produits antibiotiques pour le BK.

*(Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la Tuberculose.)*

## **ACTION D'UN ANTIGÈNE TYPHIQUE PURIFIÉ SUR LE SYSTÈME CIRCULATOIRE PÉRIPHÉRIQUE DU LAPIN**

par PAUL BOQUET, ALBERT DELAUNAY, YVONNE LEHOULT  
et JACQUELINE LEBRUN.

Injecté à la dose de 3 à 4 cm<sup>3</sup> (soit 6 à 8 mg d'extrait sec), dans la veine, sous la peau ou dans le péritoine, l'antigène glucido-lipido-polypeptidique typhique tue en quelques heures des lapins de 2.000 à

(3) P. HAUDUROY et W. ROSSET, *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **144**, 169.



2.500 g. Peu après l'injection, le revêtement cutané des animaux pâlit et se refroidit. Cette réaction est parfois si intense que le sang ne coule plus d'une incision faite dans une région où la peau est richement vascularisée. A la période d'état, l'intoxication se traduit par de la polypnée, de la diarrhée et, suivant la dose d'endotoxine employée, par de l'hyperthermie ou de l'hypothermie. Les animaux tombent enfin dans le coma et meurent après quelques convulsions.

En mesurant sur ces lapins les variations de la température cutanée, comparativement à celles de la température centrale, au moyen de couples thermo-électriques (1), on constate, cinq à quinze minutes après l'injection intraveineuse ou trente-cinq minutes après l'injection intramusculaire, un refroidissement rapide de la peau qui atteint 6, 8 et parfois 10° en dix minutes. La température périphérique présente ensuite des oscillations plus ou moins étendues. La température interne, stable pendant les trente minutes qui suivent ces épreuves, s'élève modérément, de 1 à 2°, à la période d'état. Elle se maintient à ce niveau pendant une à trois heures, puis elle s'abaisse. Les modifications de la température périphérique étant liées aux variations du débit des vaisseaux de la peau, il apparaît que le signe initial de l'intoxication typhique expérimentale est une vaso-constriction superficielle. L'examen direct du réseau vasculaire cutané confirme cette opinion.

En procédant selon la technique que nous avons récemment décrite (2), nous avons observé au microscope, avec un objectif à sec et à un faible grossissement, les vaisseaux de l'oreille de lapins normaux et de lapins intoxiqués. (3). Chez le lapin neuf, lorsque la température ambiante est constante, les petites artères sont animées, à intervalles espacés, de faibles contractions semblables à celles qui ont été observées par B. W. Zweifach, R. E. Lee, C. Hyman et R. Chambers (4), sur les artérioles mésentériques du chien. Mais leur aspect se modifie si l'on injecte dans la veine ou dans le péritoine du même lapin 3 à 4 cm<sup>3</sup>, soit 6 à 8 mg. d'antigène typhique purifié selon la méthode de A. Boivin.

Après une période d'incubation qui n'excède pas quinze minutes, une vive contraction se propage le long de ces vaisseaux. Elle est souvent si intense qu'elle interrompt la circulation sanguine. Elle se prolonge pendant plusieurs minutes, puis elle s'atténue. On voit alors les petites artères s'élargir et parfois même se dilater, mais une nouvelle contraction survient à bref délai.

Ces phases successives de contraction et de relâchement des artérioles de la peau du lapin, rappellent celles qu'on observe sur les artérioles mésentériques des cobayes soumis à l'épreuve de la même endotoxine (5). Elles s'atténuent à la période préagonique et font défaut chez les animaux témoins auxquels ont été injectés, dans les mêmes

(1) P. BOQUET, D. BOVET et Y. LEHOULT, *C. R. Acad. Sci.*, 1947, 224, 1671.

(2) P. BOQUET, Y. LEHOULT et A. GUICHARD, *Ces Annales*, 1947, 73, 912.

(3) P. BOQUET, A. DELAUNAY, Y. LEHOULT et J. LEBRUN, *C. R. Acad. Sci.*, séance du 1<sup>er</sup> décembre 1947.

(4) B. W. ZWEIFACH, R. E. LEE, C. HYMAN et R. CHAMBERS, *Ann. Surgery*, 1944, 120, 232.

(5) A. DELAUNAY, M<sup>me</sup> J. LEBRUN et M<sup>me</sup> M. DELAUNAY, *C. R. Acad. Sci.*, 1947, 224, 1595.

conditions, 3 à 4 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. Des recherches antérieures ont démontré que, concurremment, le nombre des leucocytes diminue dans le sang et que les phagocytes n'émigrent plus hors des vaisseaux vers les substances chimiotactiques introduites dans les tissus (6).

Dans quelle mesure le système sympathique local participe-t-il à ces réactions ?

Des lapins, privés depuis deux à quatre jours de leur ganglion cervical supérieur droit, sont éprouvés comme les précédents. Dans l'oreille normale et dans l'oreille éternuée, les artérioles se contractent vivement, le nombre des leucocytes circulant diminue parallèlement et le phénomène de la diapédèse est inhibé (3).

Afin de préciser la nature de ces phénomènes, des lapins intoxiqués par le même antigène ont été soumis à l'épreuve de la fluorescéine (7).

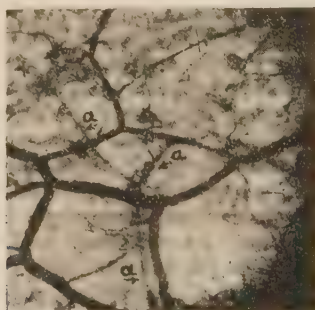


FIG. 1. — Les petits vaisseaux de l'oreille d'un lapin normal.  
a, artérioles.

Substance de faible poids moléculaire dépourvue de nocivité, la fluorescéine est dissoute à chaud dans la proportion de 5 g. pour 100 cm<sup>3</sup> de solution saline physiologique, légèrement alcalinisée par du bicarbonate de sodium, puis injectée à la dose de 1 cm<sup>3</sup> dans la veine auriculaire du lapin de 2.500 g. et de 0,5 cm<sup>3</sup> dans la veine saphène du cobaye de 300 g. Elle est mise en évidence, quelques secondes plus tard, dans les vaisseaux superficiels par un procédé physique qui consiste à exposer l'animal d'épreuve aux radiations ultraviolettes. L'intervalle compris entre le moment de l'injection et l'apparition de la fluorescence à la nictitante chez le lapin, ou dans la peau thoraco-abdominale du cobaye est le temps que met le sang à se rendre du lieu de l'injection à la région examinée. Ce temps de circulation est normalement de cinq à neuf secondes pour le lapin et de cinq à sept secondes pour le cobaye. Chez les animaux qui présentent une intoxication par l'antigène typhique purifié, le temps de circulation est inchangé pendant l'heure qui suit l'injection, en dépit du développement des réactions vaso-

(6) A. DELAUNAY et J. PAGÈS, *Ces Annales*, 1945, 71, 431.

(7) P. BOQUET, A. DELAUNAY, J. LEBRUN et Y. LEROULT, *C. R. Soc. Biol.*, 1947, 456, 272.

motrices cutanées. A mesure que l'intoxication se prolonge, le temps de circulation augmente. A la période préagonique, il atteint sept à vingt secondes chez le lapin, treize, seize, dix-huit et même quarante-cinq secondes chez le cobaye.

La réaction vasomotrice superficielle est-elle de nature à modifier la pression artérielle ? Enregistrée pendant quarante-cinq minutes après l'injection intraveineuse d'endotoxine typhique, c'est-à-dire pendant la période où les artéριοles de la peau se contractent activement, la pression carotidienne des lapins d'épreuve demeure normale. Elle baisse progressivement au cours du coma qui précède l'agonie (8).

Ces résultats nous autorisent à conclure qu'indépendamment d'une modification de la pression artérielle et du temps de la circulation

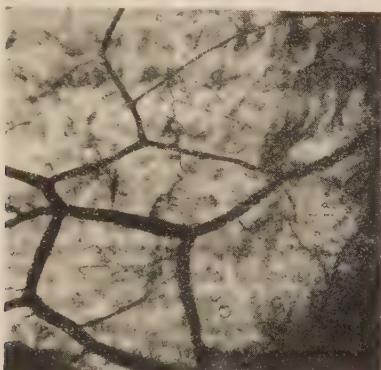


FIG. 2. — Les mêmes vaisseaux trente minutes après l'injection intraveineuse d'endotoxine typhique. Les artéριοles sont contractées.

sanguine, la réponse initiale de l'organisme à l'épreuve de l'antigène typhique purifié est une constriction des artéριοles de la peau. Ils démontrent que cette réaction et les phénomènes concomitants, la leucopénie et l'inhibition de la diapédèse ne sont pas abolis lorsqu'on supprime l'innervation sympathique locale. Ils permettent enfin d'établir un rapprochement entre les manifestations vasculaires cutanées de l'intoxication typhique expérimentale et celles qui ont été récemment décrites par R. G. Abell et H. P. Schenck (9) au cours du choc anaphylactique et par J. P. Levinson avec H. E. Essex (10) au cours du choc traumatique.

En se fondant sur les expériences de A. Boivin et Mesrobianu (11) concernant l'action hyperglycémiant de l'antigène glucido-lipido-

(8) P. BOQUET, A. DELAUNAY, Y. LEHOULT et J. LEBRUN, *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **156**, 269.

(9) R. G. ABELL et H. P. SCHENCK, *J. Immunol.*, 1938, **34**, 195.

(10) J. P. LEVINSON et H. E. ESSEX, *Proc. Soc. exp. Biol. a: Med.*, 1943, **52**, 361.

(11) A. BOIVIN et MESROBIANU, *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **117**, 273.

polypeptidique des bactéries, et sur celles de E. W. Dennis (12) qui a observé la disparition de la substance chromaffine des surrénales du lapin trois heures après l'injection du même antigène, on inclinerait à penser que la vaso-constriction ainsi constatée est la conséquence d'une libération d'adrénaline. Mais si on compare le développement progressif de la réaction vasculaire à la stabilité de la pression artérielle, il apparaît que sous l'influence de l'endotoxine typhique l'organisme met vraisemblablement en jeu d'autres facteurs humoraux ou neuro-végétatifs.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

## DURÉE DE CONSERVATION DU POUVOIR ANTIGÈNE DU VIRUS DE LA MALADIE DE NICOLAS ET FAVRE (*LYMPHOGRANULOMA VENEREUM*)

par P. LÉPINE, J.-C. LEVADITI et L. REINIÉ.

Après que Frei (1) eut en 1925 prouvé que l'injection intradermique de pus ganglionnaire provenant de malades atteints de la maladie de Nicolas et Favre (*Lymphogranuloma venereum*) détermine une réaction d'une spécificité presque absolue chez les sujets atteints de la maladie, Hellerström et Wassen (2) ont, lors de la découverte du virus, agent pathogène de la maladie, constaté la valeur antigénique du névraxe des singes infectés expérimentalement par voie intracérébrale. Ces faits contrôlés par Kleeberg et Cohn (3) ont été appliqués par C. Levaditi, P. Ravaut, P. Lépine et M<sup>lle</sup> R. Schoen (4) lesquels ont précisé la valeur de la réaction de Frei et préparé un antigène simien destiné au diagnostic de la maladie humaine.

Un tel antigène se conserve plusieurs semaines à la température du laboratoire, quelques mois à + 4° C, mais cette conservation peut être prolongée plus longtemps encore, sans faire appel aux procédés de lyophilisation par l'utilisation du froid à — 24° C.

Cette technique nous a permis les constatations suivantes.

Les exemples choisis n'ont pas fait l'objet d'une étude systématique mais ont permis pendant toute la durée de l'occupation de conserver un stock d'antigènes suffisant pour la pratique clinique malgré la pénurie de singes réceptifs.

I. ANTIGÈNE PRÉPARÉ AVEC LE CERVEAU DU « CYNOCEPHALUS BABUIN » n° 67. — Ce singe inoculé le 23 juin 1942 est sacrifié sept jours après

(12) E. W. DENNIS, *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1939, **42**, 553.

(1) FREI, *Klin. Woch.*, 1925, n° 45, 2148 et *Derm. Wochenschr.*, 1932, **95**, 1575.

(2) S. HELLERSTRÖM et E. WASSEN, *Congrès Intern. de Derm. de Copenhague*, 1930, 2047.

(3) KLEEBERG et COHN, *Derm. Wochenschr.*, 1931, **92**, 580 et 1933, **96**, 342.

(4) C. LEVADITI, P. RAVAUT, P. LÉPINE et R. SCHOEN, *Bull. Acad. Méd.*, 1931, **106**, 331 et *Ces Annales*, 1932, **48**, 27.



l'inoculation. Après contrôle de stérilité et contrôle histologique, la corticalité de son cerveau est utilisée pour préparer 1.000 cm<sup>3</sup> d'antigène de Frei. Cet antigène est conservé à — 24°. Titré dans le service du Professeur Rachet, il provoque, chez les malades atteints de lymphogranulomatose inguinale, une réaction d'intensité moyenne et ne détermine aucune réaction chez les témoins. Il constitue donc un antigène utilisable. Trois ans plus tard, en juin 1945, il demeure encore un bon antigène de Frei. Enfin, en février 1946, sa valeur antigénique est encore intacte, il est toujours classé comme antigène bon à délivrer.

La conservation de cet antigène à — 24° C a donc été d'au moins trois ans et huit mois, sans baisse appréciable de sa sensibilité et de sa spécificité.

II. ANTIGÈNE PRÉPARÉ AVEC LE CERVEAU DU SINGE « CYNOCEPHALUS BABUIN » n° 70. — Ce singe, inoculé par voie intracérébrale le 5 mars 1943 est sacrifié le huitième jour après l'inoculation. Les cultures de contrôle étant stériles et les lésions histologiques intenses, le cerveau est utilisé pour la préparation de 1.200 cm<sup>3</sup> d'antigène de Frei. En 1943, 1944, 1945 et 1946, cet antigène conserve constamment sa valeur. En novembre 1947, après quatre ans et huit mois de conservation à — 24°, il est titré à nouveau et détermine toujours des réactions d'égale intensité. Les intradermo-réactions de contrôle, effectuées avec un lot d'ampoules conservées à + 4° pendant le même délai, confirment la perte de tout pouvoir antigénique à cette température.

III. ANTIGÈNE PRÉPARÉ AVEC LE CERVEAU DU SINGE « CYNOCEPHALUS BABUIN » n° 35. — Ce singe inoculé le 22 janvier 1946 est sacrifié le sixième jour et son cerveau est conservé à la glacière à — 24° C. La valeur antigénique du névraxe est titrée le 15 mars 1946 et constitue un très bon antigène. En décembre 1946, même valeur antigénique. Le 28 octobre et le 12 novembre 1947, les réactions de Frei pratiquées à différents malades ont donné des réponses identiques. Sa conservation dépasse donc vingt-deux mois. Il est actuellement encore en usage.

D'autres antigènes avaient été préparés et conservés de semblable manière, mais ils ont été délivrés trop rapidement pour pouvoir être l'objet d'une conservation aussi prolongée.

Il est à remarquer que ces délais de conservation sont du même ordre de grandeur que ceux observés par Durieux et Arquie (5) à Dakar pour des antigènes soumis au préalable à la lyophilisation (quatre années de conservation sans observer aucune baisse de la valeur antigénique).

Actuellement, à la suite des travaux de MacKee, Rake et Shaffer (6), des antigènes vitellins sont préparés à l'Institut Pasteur en inoculant dans des œufs embryonnés une souche virulente isolée par Rake aux U. S. A., souche spécialement adaptée à la culture dans l'œuf. La conservation de la suspension antigénique est faite dans les mêmes conditions que celle de l'antigène simien. Mais le recul n'est pas

(5) C. DURIEUX et E. ARQUIÉ, *Rapport sur le fonctionnement de l'Institut Pasteur d'A. O. F. en 1943*, 74.

(6) C. MACKEE, G. RAKE et M. SHAFFER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1940, 44, 410.

encore suffisant pour indiquer la durée entière de sa conservation. L'exemple suivant prouve qu'elle dépasse au moins plusieurs mois.

Le 3 mai 1947, des sacs vitellins d'œufs de poule en incubation depuis six jours sont infectés ; ils sont prélevés six jours après l'inoculation. Le 12 mai 1947, ils sont broyés, mis en suspension en eau physiologique phéniquée à 0,5 p. 100, puis placés à 37° pendant vingt et un jours suivant la technique de Nigg et Bowser (7). Après ce délai, la suspension est conservée à la glacière à — 24° C. Cet antigène éprouvé à différentes dates a donné constamment des réponses d'une égale intensité lorsqu'il est injecté par voie intradermique à des malades atteints d'anorectite ulcéro-végétante, d'urétrite amicrobienne spécifique (type Welsh) ou d'infection inapparente. Utilisé récemment (le 12 novembre 1947), la valeur antigénique était intacte.

Cet antigène vitellin conservé à la glacière à — 24° n'a subi de ce fait aucune atténuation notable depuis six mois qu'il a été préparé.

CONCLUSION. — Sous l'influence du froid à — 24° C, sans lyophilisation préalable, l'antigène de Frei d'origine simienne conserve ses propriétés antigéniques intactes après quatre ans et huit mois de conservation et l'antigène vitellin est toujours aussi actif six mois au moins après sa préparation. Des délais de conservation plus prolongés prouveront seuls la limite de cette durée de conservation, les chiffres donnés n'étant nullement limitatifs.

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

## DOSAGE SIMPLE ET RAPIDE DE LA PÉNICILLINE ET DE LA STREPTOMYCINE DANS LES SOLUTIONS, LES ÉMULSIONS, LES POMMADES

par G. SANCHEZ et A. LAMENSANS.

Nous ne présentons ici que la technique d'une méthode de dosage particulièrement rapide, nous proposant d'en commenter les détails par ailleurs.

Le principe en a déjà été exposé (1) : *Lactobacillus bulgaricus* se multiplie dans le lait à 45° C avec une extrême rapidité, provoquant la coagulation du milieu en deux heures trente. Le développement de ce germe est inhibé d'une manière constante par de faibles concentrations de pénicilline, de streptomycine ou de tyrothricine. La méthode des dilutions permet de comparer l'activité d'un antibiotique de référence avec celle de produits à tester.

Nous avons mis au point deux méthodes :

L'une concerne les produits contenant au moins 0,3 unité Oxford

(7) C. NIGG et B. BOWSER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1943, **53**, 192.

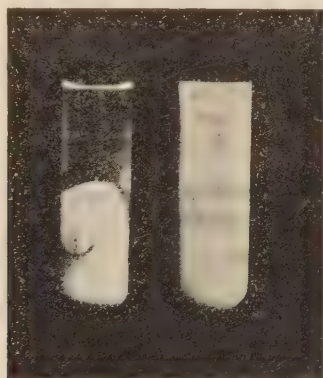
(1) G. SANCHEZ et A. LAMENSANS, *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224**, 1189.

par centimètre cube pour la pénicilline ou 1 unité Waksman pour la streptomycine. Elle est utilisable pour le titrage des solutions courantes et le contrôle des produits industriels (milieux de culture, opérations d'extraction). Elle permet le titrage des pommades et des émulsions, directement, sans aucune manipulation spéciale.

L'autre, une microméthode, détecte jusqu'à 0,03 unité Oxford de pénicilline, 0,1 unité Waksman de streptomycine, on peut l'utiliser pour les dosages cliniques et les produits dont la concentration est inférieure à 0,5-1 unité Oxford de pénicilline ou 1-2 unités Waksman de streptomycine.

Dans l'un ou l'autre cas, la brièveté de l'incubation ne nécessite aucune précaution de stérilité, ce qui écourte encore les manipulations.

GERME TEST. — *Lactobacillus bulgaricus* (Luasen et Kuhn) encore



Le test de coagulation est très visible à gauche.

dénoté *Thermobacterium bulgaricum* par Orla Jensen. L'activité de la souche est entretenue par repiquage quotidien sur lait de vache écrémé non dilué : 0,1 cm<sup>3</sup> d'une culture antérieure dans 10 cm<sup>3</sup> de milieu neuf. On laisse coaguler à l'étuve ou au bain-marie à 45° C. Conservée ensuite en glacière, la souche est prête pour l'emploi dans les vingt-quatre heures.

MILIEU. — Lait de vache écrémé, non dilué pour la microméthode, dilué à 25 p. 100 avec de l'eau bidistillée pour la méthode ordinaire.

On peut utiliser soit du lait frais, soit du lait écrémé en poudre, soluble (100 g. de poudre pour 1 litre d'eau distillée). Le milieu réparti en flacons de 100 cm<sup>3</sup> est stérilisé à l'autoclave : 115° pendant vingt minutes.

Au moment de l'emploi, onensemence à raison de :

2,5 cm<sup>3</sup> de culture pour 100 cm<sup>3</sup> de lait non dilué ;

1,5 cm<sup>3</sup> de culture pour 100 cm<sup>3</sup> de lait dilué à 25 p. 100.

LECTURE DES RÉSULTATS. — Elle a lieu lorsque les tubes témoins sont coagulés. Le test est particulièrement net. Dans les cas douteux, excès-

sivement rares, on introduit II gouttes de l'indicateur ci-dessous :

Rouge de méthyle à 0,1 p. 100 dans l'alcool absolu. . . .	100 cm <sup>3</sup>
Bleu de méthylène à 4 p. 100 dans l'eau distillée. . . .	4 cm <sup>3</sup>

Dans ces conditions on obtient les colorations suivantes :

Pas de développement microbien. . . . .	Verte.
Début du développement stoppé. . . . .	Grise.
Développement microbien. . . . .	Rose, rouge, avec ou sans coagulation.

Un tube coloré en rose indique un développement, il est à classer parmi les tubes coagulés.

ÉTALONS. — a) *Méthode normale* : A partir de produits cristallisés dont on connaît le titre pondéral, préparer des solutions :

De pénicilline à 1 U. O. par centimètre cube dans un tampon à pH 6,8 ;

De streptomycine à 5 U. W. par centimètre cube.

b) *Microméthode* : Préparer de même des solutions :

De pénicilline à 0,2 U. O. par centimètre cube ;

De streptomycine à 0,5 U. W. par centimètre cube.

MODE OPÉRATOIRE. — a) *Méthode normale* : Chaque tube de dosage reçoit au total 10 cm<sup>3</sup> ainsi répartis :

Solution étalon ou à tester. . . . .	$n$	} $n + m = 1 \text{ cm}^3$
Eau physiologique. . . . .	$m$	
Milieuensemencé (lait à 25 p. 100). . . . .		
		9 cm <sup>3</sup>

b) *Microméthode* : Chaque tube reçoit :

Solution étalon ou à tester ou sérum. . .	$n'$	} $n' + m' = 0,5 \text{ cm}^3$
Eau physiologique . . . . .	$m'$	
Milieuensemencé (lait non dilué). . . . .		
		0,5 cm <sup>3</sup>

Aucune manipulation n'est faite aseptiquement, opérer en tubes ouverts. Le milieu peut être réparti avec un rhéomètre.

Les tubes sont agités et placés à 45° C jusqu'à coagulation des témoins, on attend encore quinze minutes, on retire les gammes et on lit les résultats.

PREMIER CAS. — La concentration des produits à tester est approximativement connue : c'est le cas des contrôles et des produits industriels où l'expérience permet de calculer d'avance les dilutions à effectuer.

On fait par dilution, avec de l'eau bidistillée, une solution du produit à tester dont la concentration présumée sera : 1 unité par centimètre cube de pénicilline ou 5 unités par centimètre cube de streptomycine. Désignons-la par le terme « dilution N ». Cette solution diluée au 1/2 est la dilution N/2.

Pour la microméthode on prépare de même une dilution P (0,5 unité par centimètre cube de pénicilline ou 1 unité par centimètre cube de streptomycine) et cette solution au 1/5 : P/5.



Les tubes composant la gamme étalon reçoivent respectivement :

a) PÉNICILLINE. — O (tube témoin), 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60 cm<sup>3</sup> de solution étalon de 1 unité par centimètre cube pour la *méthode ordinaire*.

O (tube témoin), 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50 cm<sup>3</sup> de solution étalon à 0,2 U. O. par centimètre cube pour la *microméthode*.

b) STREPTOMYCINE. — O (tube témoin), 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50 cm<sup>3</sup> de solution étalon à 5 U. W. par centimètre cube pour la *méthode ordinaire*.

0,5 U. W. par centimètre cube pour la *microméthode*.

Les tubes composant la gamme d'un produit à tester reçoivent respectivement :

a) *Dosage normal* : 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,65, 0,60, 0,55, 0,50, 0,45, 0,40, 0,35, 0,30, 0,25, 0,20, 0,15, 0,10 cm<sup>3</sup> de la dilution N.

0,75, 0,65, 0,575, 0,550, 0,525, 0,475, 0,45, 0,425 cm<sup>3</sup> de la dilution N/2.

b) *Microméthode* : 0,5, 0,4, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, 0,125, 0,1 cm<sup>3</sup> de la dilution P.

0,4, 0,35, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, 0,10, 0,05 cm<sup>3</sup> de la dilution P/5.

Tous les tubes reçoivent encore de l'eau physiologique et le milieuensemencé comme il est dit plus haut.

DEUXIÈME CAS. — *La concentration des produits à tester est inconnue (deux temps).*

a) Détermination de l'ordre de grandeur de la concentration : cette opération permet de calculer le taux de la dilution à employer au deuxième temps tout en donnant une approximation déjà utilisable.

Faire des dilutions au 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1.000...

Dans une série de tubes, introduire respectivement : 1 cm<sup>3</sup> d'une des dilutions successives et 9 cm<sup>3</sup> de milieuensemencé.

Il est possible aussi d'effectuer les dilutions directement dans les tubes de dosage, mais ne pas tenir compte alors de la dilution supplémentaire apportée dans le premier tube par l'introduction de 1 cm<sup>3</sup> de solution à tester dans 9 cm<sup>3</sup> de milieu, ce premier tube constitue la dilution 1.

b) Détermination précise : utiliser le taux de dilution du premier tube où la coagulation ne s'est pas produite, c'est la dilution N de la gamme décrite dans le premier cas. Exemple :

Le tube contenant la dilution 1/1.000 est coagulé;

Le tube contenant la dilution 1/500 n'est pas coagulé,

la dilution à utiliser est : dilution N = 1/500.

CALCULS. — Extrêmement simples. Un exemple :

Le premier tube non coagulé de la gamme étalon contient 0,5 U. Le premier tube non coagulé de la gamme étalon est celui où l'on introduit 0,4 cm<sup>3</sup> de dilution 1/100 par exemple, cela veut dire que 0,4 cm<sup>3</sup> de la dilution 1/100 de la solution à tester contiennent 0,5 U. O. de pénicilline; titre de la solution :  $0,5/0,4 \times 100 = 125$  U. O. par centimètre cube.

DOSAGE DANS LES ÉMULSIONS ET LES POMMADÉS. — Dans une fiole jaugée de 10 cm<sup>3</sup>, peser 1 g. d'émulsion en véhicule retard ou de pommade. Faire fondre au bain-marie à 45° et compléter le volume de 10 cm<sup>3</sup> avec du lait non dilué porté à 45°. Boucher et émulsionner en agitant vigoureusement. Opérer ensuite comme pour les solutions ordinaires, mais faire les dilutions avec du lait non dilué à 45° et agiter fortement à chaque fois.

Il est particulièrement important dans l'industrie de savoir déterminer rapidement le moment propice pour commencer l'extraction des milieux. Les méthodes biologiques usuelles qui demandent dix-huit heures d'incubation constituent un handicap sérieux. La technique que nous présentons permet de déterminer en deux heures trente avec une erreur maxima de 10 p. 100 la richesse des milieux et d'effectuer rapidement et à tout moment le contrôle des opérations. Elle ne nécessite qu'un matériel courant, le microbe employé n'est pas pathogène, les manipulations peuvent être effectuées à tubes ouverts sans précaution de stérilité par un personnel ne possédant aucune pratique bactériologique.

(Laboratoire des fermentations. Laboratoire de Chimie thérapeutique B. Institut Pasteur de Paris.)

## SÉPARATION DES DEUX ISOMÈRES BIOLOGIQUES DE L'ACIDE AMINO-BENZOÏQUE (ORTHO ET PARA) AU MOYEN DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

par JOSEPH TABONE et M<sup>lle</sup> DAISY ROBERT.

La caractérisation et le dosage de l'acide para-amino-benzoïque (P.A.B.) se heurtent à de grandes difficultés.

Les réactions colorées utilisées pour caractériser l'acide P.A.B. sont également positives avec un certain nombre d'autres substances normalement présentes dans les milieux biologiques et surtout dans les hydrolysats alcalins de ces milieux qui conviennent plus encore que ces milieux eux-mêmes à la recherche de l'acide P.A.B. (1).

Ces substances ont été certainement à l'origine de confusions très graves.

Parmi ces substances, il en est une, l'acide ortho-amino-benzoïque (O.A.B.), isomère biologique du P.A.B. et qui, en tant que produit du métabolisme du tryptophane, doit être considérée comme universellement répandue dans les milieux biologiques. Les caractères physico-chimiques de l'acide O.A.B., extrêmement proches de ceux de l'acide P.A.B., font qu'il est très probable que l'acide O.A.B. se retrouve finalement en même temps que l'acide P.A.B. dans les fractions hautement

(1) J. TABONE, C. MAGIS et J. TROESTLER, *Bull. Soc. Chim. biol.* (sous presse).

purifiées dans lesquelles certains auteurs ont cru pouvoir concentrer l'acide P.A.B. exclusivement.

Dans une note précédente (2) nous avons montré qu'il était possible de caractériser l'acide P.A.B. lorsqu'il était en présence de son isomère biologique en mettant à profit les vitesses de copulation extrêmement différentes du monochlorhydrate de la N-2-naphtyldiéthylpropylène-diamine (R. IV.) avec les sels de diazonium de ces substances. Cependant cette méthode, si elle permet de caractériser l'acide P.A.B., ne permet pas de le séparer de son isomère.

Plus tard Lederer (3) a abordé le problème de la séparation des acides O.A.B. et P.A.B.

Partant de données physico-chimiques sur lesquelles nous ne pouvons insister ici, cet auteur a pensé pouvoir réaliser la séparation de ces deux substances (absorption de l'acide P.A.B. contrairement à l'acide O.A.B.) en utilisant une colonne d'alumine acide et des procédés spéciaux de chromatographie. Cependant, les résultats n'ont pas répondu aux espoirs de cet auteur. Sa méthode ne convient pas à la séparation des deux isomères.

Nous avons alors pensé que la méthode de chromatographie sur papier proposée par Martin et Synge (4) méritait d'être essayée.

**TECHNIQUE ET RÉSULTATS.** — Nous avons utilisé l'appareil proposé par Martin et Synge et comme support le papier Durieux (sans cendres). Les solvants qui nous ont donné les meilleurs résultats sont l'alcool butylique saturé d'eau et l'alcool isoamylique saturé d'eau. En prolongeant suffisamment la durée de l'expérience, nous avons obtenu, avec l'alcool isoamylique, une séparation convenable des deux isomères.

Il a été déposé sur le papier :

1° 0,0005 cm<sup>3</sup> d'une solution au 1/2.000 d'acide P.A.B., soit 1  $\gamma$ .

2° 0,0005 cm<sup>3</sup> d'une solution au 1/2.000 d'acide O.A.B., soit 1  $\gamma$ .

3° 0,001 cm<sup>3</sup> d'une solution du mélange à parties égales des deux solutions précédentes soit 1  $\gamma$  de P.A.B. + 1  $\gamma$  de O.A.B.

Le papier a été soumis ensuite à la chromatographie pendant vingt-quatre heures, puis, après dessiccation à l'étuve à 80°, soumis à la pulvérisation d'une solution alcoolique et légèrement chlorhydrique du réactif d'Ehrlich. Le papier est maintenu ensuite quelques instants à l'étuve. Les positions occupées par les substances apparaissent sous l'aspect de taches jaunes légèrement oblongues.

Nous avons déterminé le rapport des chemins parcourus par chacune des substances au chemin parcouru par le solvant.

Ces rapports sont :

Pour P.A.B. . . . .	0,50
Pour O.A.B. . . . .	0,70

Ces rapports restent constants, quelle que soit la durée de l'expérience, c'est-à-dire quel que soit le chemin parcouru par le solvant.

(2) J. TABONE et C. MAGIS, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1946, 28, 184.

(3) E. LEDERER et TCHEN PAU KIUM, *Bioch. et Bioph. Acta*, 1947, 1, 35.

(4) MARTIN et SYNGE, *Bioch. J.*, 1941, 35, 1358. — CONSDEN, GORDON et MARTIN, *Biochem. J.*, 1944, 38, 224.

Ceci pour un papier déterminé (Durieux sans cendres). Si l'on s'adresse à d'autres papiers, les valeurs de ces rapports changent, celui de l'acide P.A.B. restant cependant nettement inférieur à celui de l'acide O.A.B.

**CONCLUSION.** — La chromatographie sur papier telle qu'elle a été proposée par Martin et Synge convient bien à la séparation des deux isomères biologiques de l'acide amino-benzoïque (ortho et para) quand on utilise comme solvant l'alcool isoamylique saturé d'eau et comme support le papier Durieux sans cendres. Les expériences ont porté sur des quantités de substance égales à 1 $\gamma$  et 2 $\gamma$  (\*).

(Institut Pasteur.)

## POUVOIR ANTIGÉNIQUE DE LA COAGULASE STAPHYLOCOCCIQUE

### I. — ÉTUDE DU PLASMA DES LAPINS TRAITÉS AVEC CETTE SUBSTANCE

par P. MERCIER, J. PILLET et R. PERY.

Signalée pour la première fois par Delezenne (1) en 1898, la propriété que possèdent les staphylocoques pathogènes de coaguler le plasma oxalaté a fait, depuis, l'objet de nombreux travaux. En dépit de ceux-ci, l'importante question du pouvoir antigénique de la substance responsable de cette coagulation reste très controversée et c'est à l'étude de ce problème que nous consacrons cette note.

Bien que Kemkès, dès 1928, ait annoncé que le sérum antistaphylococcique ne neutralisait pas la coagulase et que divers essais d'immunisation réalisés par Gross (3), Cruickshank (2), Walston (6), aient donné des résultats négatifs, certaines anomalies de la coagulation de différents plasmas amènent ces auteurs à faire des réserves sur les conclusions à tirer de leurs expériences. C'est ainsi que Gross (4) en 1933 constate que les sérums antistaphylococciques d'hommes et de lapins sont capables d'inhiber la coagulation jusqu'à des dilutions de 1/3 et que, d'autre part, Cruickshank et Walston et, plus récemment, Lominski et Roberts (5) [1946] faisant état de différences sensibles existant entre la coagulation du plasma de divers sujets, atteints ou non de staphylococcie, tendent à expliquer ces différences par l'action d'une substance inhibitrice présente dans le sang de ces individus.

C'est dans le but d'obtenir des précisions sur cette question que nous

(\*) Dans un mélange renfermant les trois isomères, la tache correspondant au dérivé méta est située, dans tous les cas, très nettement au-dessus de celles correspondant aux deux autres isomères.

(1) C. DELEZENNE, *Arch. Physiol. Norm. Pathol.*, 1898, **5**, 508.

(2) R. CRUICKSHANK, *J. Path. Bact.*, 1937, **45**, 295.

(3) H. GROSS, *Zentralbl. Bakt.*, 1931, **122**, 254.

(4) H. GROSS, *Klin. Wochensh.*, 1933, **12**, 304.

(5) I. LOMINSKI et G. B. S. ROBERTS, *J. Path. Bact.*, 1940, **58**, 187.

(6) H. D. WALSTON, *J. Hyg.*, 1935, **35**, 549.



avons recherché si la coagulase injectée par voie intra-veineuse à des lapins modifie la coagulabilité de leur plasma lorsque celui-ci est soumis ensuite à l'action de la staphylocoagulase.

**MATÉRIEL.** — *Plasma.* — On recueille par ponction cardiaque 10 cm<sup>3</sup> de sang de chacun des lapins en expérience que l'on oxalate à 0,2 p. 100 ; les sangs sont ensuite centrifugés et les plasmas recueillis séparément sont dilués au 1/5 avec de l'eau physiologique.

*Coagulase.* — Les liquides coagulants sont obtenus par filtration sur bougie L<sub>3</sub> de culture de staphylocoque de quarante-huit heures. Nous avons testé les variations de coagulabilité des plasmas à l'aide de deux coagulases différentes et avons choisi pour cela des souches de staphylocoques de caractères biologiques différents. Nous avons utilisé la souche 141, productrice de toxine  $\alpha$  et  $\beta$  et non fibrinolytique et la souche 24 ne produisant que de la toxine  $\alpha$ , mais fibrinolytique.

Les essais d'immunisation ont été pratiqués avec une coagulase 141 active au 1/100°. Les lapins témoins ont reçu les mêmes quantités d'un filtrat de quarante-huit heures d'une culture de staphylocoques coagulase négative souche n° 151.

**TECHNIQUES.** — *Nombre et intervalle des injections.* — Les injections intra-veineuses de coagulase ont été poursuivies pendant quatre semaines à raison d'une injection quotidienne, pendant trois jours consécutifs, chaque semaine, aux doses suivantes : Première semaine, 0,5, 1 et 1,5 cm<sup>3</sup>. Deuxième semaine, 1,5, 2, 2 cm<sup>3</sup>. Troisième et quatrième semaines, 2, 2, 2 cm<sup>3</sup>.

Les animaux furent saignés à la fin de la cinquième semaine et leur plasma fut oxalaté et dilué comme il a été dit plus haut.

*Recherche des variations de coagulabilité des plasmas.* — Avant et après la série d'injections, les expériences suivantes ont été réalisées : les deux coagulases 141 et 24 ont été réparties chacune dans une série de 10 tubes à dose croissante de 1 à 10 cm<sup>3</sup>. Les 9 premiers tubes furent complétés à 10 cm<sup>3</sup> avec de l'eau physiologique. On obtient ainsi des dilutions croissantes de coagulase allant du filtrat pur au filtrat dilué au 1/10°. On répartit alors chacun des plasmas dilués au 1/5° dans deux séries de 10 tubes à hémolyse à raison de 0,5 cm<sup>3</sup> par tube et l'on ajoute à chacun d'eux 0,5 cm<sup>3</sup> d'une des dilutions de chaque coagulase.

On suit alors la coagulation en effectuant 5 lectures au bout d'une demi, une, quatre, six et vingt-quatre heures.

**RÉSULTATS.** — Les résultats (Cf. tableau) peuvent se résumer ainsi : chez les lapins ayant reçu une série d'injections de coagulase comme chez les lapins témoins qui furent traités par un filtrat inactif, on n'enregistre pas de modification sensible, qualitative ou quantitative, dans la coagulation de leur plasma.

Le plasma du lapin n° 76-77 donne des résultats contradictoires, mais nous avons observé que ce plasma se conservait mal et présentait, même maintenu à la glacière, une tendance spontanée à la coagulation. Or, il se trouve que dans les deux séries où on constate une coagulation nulle ou très partielle, il a été titré après trois jours de séjour à la glacière.

FILTRAT injecté	NUMÉRO des lapins	DILUTION COAGULASE 141 (C)				
		C = 9 H <sub>2</sub> O = 1	C = 7 H <sub>2</sub> O = 3	C = 5 H <sub>2</sub> O = 5	C = 3 H <sub>2</sub> O = 7	C = 1 H <sub>2</sub> O = 9
131	48-49	+++ 1	++	0	0	0
131	64-65	+++ (1)	+++	+++	++	0
		++	+	+	0	0
		+++	+++	+++	+++	0
131	70-8	+++	+++	+	0	0
		+++	+++	+++	+++	0
141	14-15	+++	+	0	0	0
		+	+	+	+	0
141	46-47	+++	+++	+	0	0
		+++	+++	+++	+++	+
141	50-51	+++	+	0	0	0
		++	++	++	+	0
141	76-77	0	0	0	0	0
		+++	++	++	++	++
141	72-73	+++	+++	0	0	0
		+++	+++	+++	+++	0
141	96-97	+++	+++	++	+++	0
		+++	+++	+++	+++	+++

N. B. — Les signes +++ à 0 indiquent le degré de coagulation.

(1) Pour chaque test, la ligne supérieure représente les résultats avant la série d'injections et la ligne inférieure, ceux après l'essai d'immunisation.

Cette anomalie peut s'expliquer par l'élimination de la majeure partie du fibrinogène lors de la coagulation spontanée.

Nous concluons donc de ces expériences que la coagulase ne semble pas se comporter comme un antigène ou tout au moins que la méthode d'examen direct que nous avons employée ne permet pas de mettre en évidence la production d'anticorps inhibant la coagulation du plasma chez des animaux soumis à des injections répétées de coagulase staphylococcique.

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

## POUVOIR ANTIGÉNIQUE DE LA COAGULASE STAPHYLOCOCCIQUE

### II. — ÉTUDE DU SÉRUM DES LAPINS TRAITÉS AVEC CETTE SUBSTANCE

par J. PILLET, P. MERCIER et R. PERY.

Nous avons rapporté dans une note précédente qu'en observant directement la coagulation du plasma d'animaux ayant reçu des injections de staphylocoagulase, il nous avait été impossible de démontrer la

production dans ces plasmas d'anticorps susceptibles d'inhiber ou de retarder la coagulation. Un travail récent de Lominski et Roberts (1) où ces auteurs montrent qu'ils ont pu mettre en évidence, sur un grand nombre de sérums humains d'origine variée, une substance inhibant la coagulation nous a incités à tester à nouveau le pouvoir antigénique de la coagulase sur les lapins, en utilisant cette fois le sérum des animaux au lieu de leur plasma. Lominski et Roberts, en effet, s'appuyant sur les anomalies de la coagulation de certains plasmas rapportés par différents auteurs (2) et sur le fait que certains plasmas ne coagulent bien que si on les emploie dilués, pensent que ces phénomènes sont dus à l'existence dans le sang d'une substance inhibitrice. Ils parviennent à en démontrer l'existence en utilisant une méthode indirecte, basée sur l'inhibition sur les sérums de l'action de la staphylocoagulase sur un système coagulant standard.

Cette substance existe à des taux variables dans 212 des 348 sérums qu'ils ont examinés. Elle précipite avec la fraction globulinique du sérum, semble agir spécifiquement sur la staphylocoagulase et se combine avec celle-ci d'une manière graduelle et limitée.

Ces propriétés rappelant celles des anticorps, il nous a paru intéressant, après avoir mis en évidence cette substance dans le sérum de lapin, de rechercher si l'injection intraveineuse de coagulase permettait d'augmenter son taux dans le sang.

Si cela était, on pourrait conclure, d'une part, que la staphylocoagulase est douée de pouvoir antigénique et d'autre part que la substance mise en évidence par Lominski et Roberts représente l'anticorps correspondant.

**MATÉRIEL.** — *Plasma.* — Le sang de plusieurs lapins obtenu par ponction cardiaque est oxalaté à 0,2 p. 100 et centrifugé, on prélève le plasma que l'on dilue au 1/3 avec de l'eau physiologique.

*Sérums.* — Chaque lapin est saigné à l'oreille et après rétraction du caillot, les sérums recueillis séparément sont chauffés à 56° pendant trente minutes pour y détruire la thrombine résiduelle, puis dilués dans des proportions que nous indiquerons plus loin.

**COAGULASE.** — La coagulase employée pour le test est le produit de la filtration d'une culture de quarante-huit heures de la souche 24.

**TECHNIQUE. NOMBRE ET INTERVALLE DES INJECTIONS.** — Le protocole expérimental est identique à celui décrit dans la note précédente.

**MISE EN ÉVIDENCE DE LA SUBSTANCE INHIBITRICE.** — Avant et après la série d'injections de coagulase, nous avons recherché la substance inhibitrice selon la technique de Lominski.

Chaque sérum a subi 10 dilutions successives, la concentration en sérum de chaque dilution différant de 100 p. 100 avec celle de la précédente. On obtient une série de dilutions allant du sérum pur au sérum de 1/512.

Chaque dilution de sérum est répartie sous le volume de 0,5 cm<sup>3</sup>

(1) I. LOMINSKI et G. B. S. ROBERTS, *J. Path. Bact.*, 1946, 58, 187.

(2) Voir références 2, 3, 4, 6 de la note précédente.

dans 10 tubes à hémolyse, auxquels on ajoute 0,2 cm<sup>3</sup> de coagulase 24. Ces mélanges sont mis en incubation à 37° pendant deux heures, après quoi on ajoute à chacun d'eux 0,3 cm<sup>3</sup> de plasma au 1/3. On porte à nouveau à l'étuve et on suit la coagulation en faisant des lectures au bout de deux, trois, cinq et vingt-quatre heures.

Les résultats enregistrés dans le tableau sont ceux obtenus après cinq heures d'étuve. Au moment, une série témoin sans sérum présentait une coagulation complète +++

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avant et après les injections, nous nous sommes servis, lors des deux séries de tests, de mélanges de plasmas qui, sous l'action d'une même coagulase, coagulaient en des temps et à des dilutions semblables.

FILTRAT injecté	NUMÉRO des lapins	DILUTION DES SÉRUMS				
		1 2	1 8	1 16	1 32	1 128
151	48-49	+++ (1)	0	0	0	+
		0 (1)	0	0	0	+-
151	64-65	+++	0	0	0	++
		0	0	0	0	+
151	70-8	0	0	0	0	+++
		0	0	0	0	+-
144	44-45	+-	0	0	0	+++
		+++	0	0	0	+
144	46-47	0	0	0	0	++
		+++	0	0	0	+++
141	50-51	0	0	0	0	+++
		+++	0	0	0	+-
141	72-73	0	0	0	0	+++
		0	0	0	0	+
141	76-77	+++	0	0	+	+++
		+++	0	0	0	0
141	96-97	+++	++	+	0	+-
		+++	0	0	0	+-

N. B. — Les signes +++ à 0 indiquent le degré de coagulation.  
 (1) Pour chaque test, la ligne supérieure représente les résultats avant la série d'injections et la ligne inférieure, ceux après l'essai d'immunisation.

Il apparaît tout d'abord que le fait de laisser en contact à l'étuve le sérum de lapins présumés neufs et la coagulase fait perdre à celle-ci une partie de son activité. Ces résultats ont été confirmés par l'examen des sérums de 11 autres lapins neufs où la même inhibition a été constatée jusqu'à des dilutions allant de 1/16 au 1/64 suivant les cas.

Ces résultats confirment donc, en les étendant à l'animal, les résultats obtenus par Lominski et Roberts.

Il est à noter qu'avec la plupart des sérums, on observe une coagulation précoce dans les deux premiers tubes de chaque série. Ce phénomène est difficile à interpréter, mais peut s'expliquer pour une part, par l'augmentation de viscosité occasionnée par l'addition de sérum pur, ou dilué seulement deux fois.



La seconde constatation qui se dégage de ces expériences est que l'injection intraveineuse de coagulase ne semble pas modifier le taux de la substance inhibitrice.

Ceci nous amène à énoncer les conclusions suivantes :

Testée par cette méthode, la coagulase ne paraît pas douée de pouvoir antigénique.

Si la substance inhibitrice contenue dans les sérums est un anticorps, l'antigène correspondant ne semble pas être la staphylocoagulase.

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

**Etude quantitative du bactériophage de la mer**, par A. GUELIN.

**Etude des propriétés bactériostatiques de la clitocybine**, par C. RIVIÈRE, Louis et Léone SALOMON, M. THELY et G. GAUTRON.

**Emploi des lysats bactériophagiques obtenus en milieu nutritif pauvre pour la préparation des sérums antiphages**, par P. NICOLLE et P. DUCREST.

**La 2-méthyl-4-amino-5-amino-méthyl-pyrimidine, facteur de croissance pour les formes S et R d'une souche de bacilles paratuberculeux**, par A. LUTZ.

**Action de l'acide p-aminobenzoylglutamique et des oxyméthyl-ptérines sur *Lactobacillus casei***, par MM. VISCONTINI, R. GAVARD et M<sup>lle</sup> J. MILLET.

---

## Séance du 8 janvier 1948.

Présidence de M. MAGROU.

---

### COMMUNICATIONS

#### A PROPOS DU TRAITEMENT ANTIRABIQUE APRÈS MORSURE DE LOUP

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

L'intéressant travail de M. Ghodssi (1) : « Sur dix années de traitement antirabique en Iran » appelle de notre part quelques remarques

(1) M. GHODSSI, *Ces Annales*, 1947, 73, 900.

car nous ne voudrions pas que la forte mortalité signalée par lui fût attribuée à la méthode pasteurienne ou au vaccin phéniqué que l'un de nous préconise dans le *Traité de Médecine* en cours de publication. Cette communication s'est croisée avec une autre faite par nous à la séance du 28 octobre de l'Académie nationale de Médecine : « La rage du loup, critérium de l'efficacité de la vaccination pasteurienne ». Ce travail paraîtra plus développé dans les Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. La mortalité signalée par M. Ghodssi est très élevée. Trente-huit décès observés en dix ans n'ont pas été enregistrés parce que s'étant produits au cours du traitement ou quelques jours après lui. Les autres cas de mort, c'est-à-dire les succès vrais, étaient dus à des morsures de loups : « 36 décès parmi 147 blessures, sauf 2 cas dont l'un était dû aux morsures d'un chien et l'autre d'un chacal » [mortalité pour les morsures de loup : 34 décès sur 145 morsures (23,44 p. 100) ; mortalité globale : 36 décès sur 2.135 morsures (1,68 p. 100)]. Ces chiffres sont très supérieurs à ceux qui, dans des conditions analogues, sont observés en Turquie, en Roumanie, en Yougoslavie où les morsures de loup sont fréquentes. Nous n'insisterons pas. Certainement, en cas de morsure de loup, le traitement doit être prolongé et au delà de vingt jours — nous le prolongions pendant trente jours à Constantinople — mais l'intensité de la cure dès le début importe plus encore que la prolongation. Si on emploie le vaccin phéniqué — et celui-ci n'est nullement contre-indiqué — la dose de 6 cm<sup>3</sup> peut, sans inconvénient, être doublée et répétée deux, trois, sinon quatre fois par jour. Que risque-t-on puisqu'il s'agit d'un vaccin mort ? Le dilemme : « Traitement intensif et paralysie, traitement bénin et succès » n'a-t-il pas fait long feu ? Le plus souvent, ce sont les traitements bénins et les traitements dits de complaisance qui déterminent les accidents paralytiques. Nous avons même émis l'hypothèse que dans les morsures de loups les plus graves, le traitement dit supra-intensif de Ferran pourrait être appliqué. La communication de M. Ghodssi pose avec raison la très importante question de la rage du loup. Au moment où la vaccination pasteurienne est très attaquée par l'Ecole américaine, cette rage du loup constitue, à notre avis, un véritable critérium de son efficacité. Il est à désirer qu'elle soit mise à l'ordre du jour de la future Conférence internationale de la Rage et nous demanderons à en être le rapporteur.

Est-il conforme à la modestie d'ajouter que c'est l'Institut Pasteur de Tanger qui a démontré le premier que la virulence cérébrale dépassait souvent le taux de 1/100.000 [au lieu de 1/10.000 (Högyes)], que les moelles desséchées dans les flacons Pasteur perdaient leur virulence dès le quatrième jour [au lieu du sixième (méthode pasteurienne classique)], les moelles desséchées glycerinées le dixième au lieu du trentième (Calmette) et que l'accident syncopal, comme l'appelle M. Ghodssi, le choc phéniqué, comme on l'appelle le plus souvent, n'était qu'un choc lapinique pouvant être supprimé complètement par la substitution au lapin du mouton (Institut Pasteur de Changhai) ou du chien (Institut Pasteur de Tanger).

(Institut Pasteur de Tanger.)



## DÉTERMINATION PAR ULTRAFILTRATION DE LA TAILLE DU VIRUS DE LA LEUCOPÉNIE INFECTIEUSE DES CHATS

par P. LÉPINE et V. PAVILANIS.

Le virus de la leucopénie infectieuse des chats, dont la présence en France a été reconnue par P. Lépine et V. Sautter (1) et dont les premières souches ont été isolées à Lyon par Brion et Bertrand (2) et à Paris par V. Pavilanis (3), n'a guère été étudié jusqu'ici que du point de vue épidémiologique, et ses constantes physiques nous sont encore inconnues. C'est pourquoi il était intéressant de chercher à déterminer sa taille par ultrafiltration sur membranes de porosité graduée.

Cinq expériences ont été réalisées dans ce but, trois avec le virus lyonnais, deux avec le virus parisien, les résultats obtenus avec les deux virus étant du reste parfaitement concordants.

La source du virus a été, dans tous les cas, représentée par le foie d'animaux sacrifiés avec des symptômes typiques à la période agonique d'une leucémie aiguë.

L'organe prélevé, dont la stérilité a été par ailleurs contrôlée, a été broyé au mortier, mis en suspension dans du bouillon ordinaire au taux de 1/40 puis filtré sur papier-sable et sur membrane dégrossissante (porosité 1.000  $\mu$ ), avant d'être passé parallèlement sur les membranes calibrées, montées sur l'appareil de F. Dunoyer.

Le filtrat recueilli après ultrafiltration a été inoculé par voie sous-cutanée à la dose de 7 à 10  $\text{cm}^3$ , à des chats neufs dont la formule sanguine a été examinée quotidiennement pendant la durée de l'expérience. Lorsque le filtrat renfermait du virus on voyait survenir à partir du quatrième ou cinquième jour, la leucopénie caractéristique allant parfois jusqu'à la disparition quasi totale des leucocytes et entraînant généralement la mort de l'animal entre le septième et le treizième jour. Les animaux ayant succombé ou sacrifiés étaient autopsiés soigneusement ; la constatation des inclusions typiques de la maladie dans la rate, la moelle osseuse et la paroi intestinale a, dans tous les cas, confirmé le diagnostic.

Un total de 40 chats a été ainsi inoculé dans les 5 expériences. Malgré le soin apporté à nous procurer de très jeunes animaux neufs, quatre d'entre eux n'ont pas réagi à l'inoculation des filtrats sur papier-sable ou sur membrane dégrossissante qui auraient dû se montrer à coup sûr infectieux, faisant ainsi preuve d'une immunité naturelle vraisemblablement provoquée par une infection latente. C'est la raison

(1) P. LÉPINE, Leucopénie infectieuse des chats, in *Traité des ultravirus des maladies animales*, Maloine, 1943, p. 913.

(2) A. BRION et M. BERTRAND, *Bull. Acad. vétér. France*, 1946, 49, 22.

(3) V. PAVILANIS, *Ces Annales*, 1947, 73, 1046.

pour laquelle nous avons tenu à répéter les expériences afin d'éviter toute erreur dans la détermination du point terminal de filtration.

Si l'on analyse l'ensemble des résultats obtenus, nous constatons que le virus a franchi toutes les membranes ayant un diamètre de pores échelonné entre 710 et 130  $m\mu$  ; par contre, la membrane de 110  $m\mu$  (2 essais) et celle de 93  $m\mu$  (4 essais) et, à plus forte raison, toutes les membranes ayant des pores d'un diamètre inférieur ont constamment retenu le virus dans les cinq expériences consécutives. En appliquant le facteur de correction d'Elford et Ferry au diamètre de la membrane de 130  $m\mu$  représentant le point terminal de filtration, on peut ainsi attribuer au virus un diamètre particulaire d'environ 80 à 100  $m\mu$ .

CONCLUSION. — Le diamètre du virus de la leucopénie infectieuse des chats, apprécié par ultrafiltration sur membrane graduée d'émulsions virulentes de foie d'animaux ayant succombé à une maladie typique, est de 80 à 100  $m\mu$ .

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

..

## COMMUNIQUÉ

Le *British Council* nous prie d'annoncer qu'un *Cours complémentaire de Médecine tropicale* aura lieu à l'Ecole de Médecine Tropicale de Liverpool, du 2 au 23 juillet 1948.

Ce cours s'adresse en principe, mais non exclusivement, aux médecins ayant déjà un diplôme de médecine tropicale, et à ceux qui désirent se mettre au courant des problèmes modernes de la pathologie coloniale.

En outre des cours, des visites et des excursions sont organisées, qui donneront l'occasion aux auditeurs de faire connaissance avec la Grande-Bretagne d'aujourd'hui.

Un certain nombre de places ont été réservées aux auditeurs français, desquels il sera perçu seulement un droit d'inscription réduit de 3 livres sterling par semaine, ce prix comprenant les cours, le logement à l'Université et la participation aux visites et excursions.

S'adresser pour renseignements et inscriptions avant le 7 mai à M. le Délégué scientifique du *British Council*, 28, avenue des Champs-Élysées, Paris (8<sup>e</sup>).

---

Le Gérant : G. MASSON.